

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Estudo das “*Hybrid Cluster Proteins*” de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Fábio Alexandre Paulino Pereira

Dissertação
Mestrado em Bioquímica
Área de especialização em Bioquímica Médica

2012

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Estudo das “*Hybrid Cluster Proteins*” de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Fábio Alexandre Paulino Pereira

Dissertação
Mestrado em Bioquímica
Área de especialização em Bioquímica Médica

Orientadores:

Doutora Lígia M. Saraiva, Instituto de Tecnologia Química e Bioquímica

Doutor Francisco Pinto, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

2012

Agradecimentos

Quero agradecer a todos aqueles que de uma forma direta ou indireta contribuíram para realização do presente trabalho:

Agradeço à minha orientadora externa, Doutora Lígia Saraiva, não só por me ter aceite no seu laboratório, depositando em mim a sua confiança, mas também por tudo o que me ensinou, promovendo simultaneamente autonomia e apoio, estando sempre disponível para qualquer problema, questão ou pânico que surgisse da minha parte. Agradeço acima de tudo pela paciência demonstrada não só ao longo de todo o trabalho, mas principalmente na reta final.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório não só pelo excelente ambiente e companheirismo que criaram, mas também por toda a disponibilidade e prontidão demonstrada sempre que precisei de apoio. Agradeço em especial à Susana Lobo, não só pelo grande apoio e companheirismo que me dispensou, garantindo o esclarecimento de qualquer dúvida bem como aligeirando o ambiente, tornando a experiência extremamente agradável. Agradeço também à Mafalda Figueiredo, por todo o apoio que me dispensou, e visto ser a pessoa com maior familiaridade por todo o trabalho por mim desenvolvido, toda a formação e apoio que me garantiu. À Lígia Nobre agradeço todo o companheirismo e sinceridade que lhe são inerentes.

Agradeço também à Cláudia Almeida por todo o apoio demonstrado na averiguação da aplicabilidade do Chemidoc XRS⁺ para a detecção de quimioluminescência bem como em todas as formações sobre a utilização de equipamentos.

Agradeço também à Cristina, Rose e Lena, que me mostraram a maior das simpatias e disponibilidades sempre que precisei de qualquer favor.

Agradeço à minha mãe pelo apoio que sempre me demonstrou e à minha irmã por sempre ter sido a minha melhor amiga.

Principalmente, agradeço à minha tia, Mariana Rosa Esteves. Agradeço por todo o apoio que demonstrou ao longo de toda a minha vida bem como toda a influência que teve em mim de forma a me tornar a pessoa que sou hoje.

Resumo

As *Hybrid Cluster Proteins* são proteínas de ferro-enzofre que apresentam propriedades muito particulares como possuir um *cluster* único (*hybrid cluster*), e serem descritas como tendo atividade de hidroxilamina redutase. Contudo o seu papel *in vivo* nas bactérias onde ocorrem não foi ainda esclarecido. Em *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough existem duas Hcp's, Hcp1 e a Hcp2, que apresentam elevada homologia da sequência proteica e cuja função é ainda desconhecida. Neste trabalho estudou-se o papel das Hcp's de *D. vulgaris* Hildenborough na resposta ao stress causado pelo oxigénio atmosférico, pelo peróxido de hidrogénio e pelo óxido nítrico. No stress com oxigénio e com peróxido não se observaram diferenças na viabilidade dos mutantes para os genes *hcp1* e *hcp2* em relação à estirpe selvagem. Os ensaios de complementação em *Escherichia coli* LMS2710 (estirpe mutada numa redutase de nitrogénio) realizados com os genes *hcp1* e *hcp2* indicam também que as duas proteínas não contribuem para a resistência de *D. vulgaris* Hildenborough a este stress. Assim os dados obtidos mostram que estes genes não têm função nestas condições.

Averiguou-se o papel dos genes *roo1* e *roo2* de *D. vulgaris* Hildenborough que codificam duas proteínas *flavodiiron* que estão propostas estar envolvidas na destoxificação do óxido nítrico. Verificou-se que a expressão da Roo1 é capaz de complementar a mutação da estirpe de *Escherichia coli* referida (deletada na redutase de nitrogénio). Contudo as estirpes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough mutadas em *hcp1* e *hcp2*, quando submetidas a stress pelo NO, não mostraram diferenças de viabilidade quando comparadas com a estirpe selvagem nas mesmas condições.

Outro objetivo deste trabalho foi avaliar a afinidade do regulador HcpR para as zonas promotoras de *hcp1* e *hcp2*. Para isso procedeu-se à clonagem do gene *hcpR* de *D. vulgaris* Hildenborough em pET28a e à expressão e purificação da proteína recombinante. Realizaram-se ensaios de *Electrophoretic Mobility Shift Assay* não só com estas zonas promotoras, mas também zonas promotoras dos genes *flavodoxina (fld)*, *ferrous iron transporter (feoA)* e *alkyl hydroperoxide reductase C (ahpC)* de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough que são descritos como sendo regulados pela HcpR. Embora se tenha observado a alteração da mobilidade das sondas *hcp1*, *hcp2* e *feoA* na presença de HcpR, apenas para *hcp2* foi possível demonstrar que a mobilidade varia com o aumento da quantidade de proteína. Foi assim possível provar a ligação do regulador HcpR à zona promotora do gene *hcp2*.

Palavras chave: *Hybrid Cluster Proteins*, Hcp; *hcp1*; *hcp2*; *roo1*; *roo2*; HcpR; oxigénio; peróxido de hidrogénio; óxido nítrico; EMSA;

Abstract

The Hybrid Cluster Proteins are iron-sulfur proteins that have very specific properties as having a unique cluster (hybrid cluster) and are described as having hydroxylamine reductase activity. However its role *in vivo* in the bacteria where they occur as not yet been clarified. In *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough there are two Hcp's, Hcp1 and Hcp2, which show high protein sequence homology and whose function is still unknown. In this work, we studied the role of the Hcp's from *D. vulgaris* Hildenborough's in response to stress caused by atmospheric oxygen, hydrogen peroxide and nitric oxide. In the stress with oxygen and peroxide no differences were observed in the viability of the *hcp1* and *hcp2* gene mutants when compared to the wild-type. Complementation assays in *Escherichia coli* LMS2710 (strain mutated in a nitrogen reductase) performed with the *hcp1* and *hcp2* genes also indicate that the two proteins do not contribute to the resistance of *D. vulgaris* Hildenborough to this stress. Thus the data obtained show that these genes do not function under these conditions.

The role of the *roo1* and *roo2* genes of *D. vulgaris* Hildenborough, flavodiiron encoding two proteins which are proposed to be involved in detoxification of nitric oxide, was examined. It was found that the expression of Roo1 is capable of complementing the mutation of the strain of *Escherichia coli* above mentioned (deletion in nitrogen reductase). However strains of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough mutated in the *hcp1* and *hcp2* genes, when subjected to stress by NO, showed no differences in viability when compared with the wild type strain under the same conditions.

Another objective of this study was to evaluate the affinity of the HcpR regulator for the promoter regions of *hcp1* and *hcp2*. For this we proceeded to the cloning of the gene *hcpR* from *D. vulgaris* Hildenborough in pET28a and its expression with the follow purification of the recombinant protein. Electrophoretic Mobility Shift Assays were performed not only with these promoter regions, but also with the promoter regions of the genes flavodoxin (*fld*), ferrous iron transporter A sub-unit (*feoA*) and alkyl hydroperoxide reductase C (*ahpC*) from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough which are described as being regulated by HcpR. We observed the change of the *hcp1*, *hcp2* and *feoA* probe's mobility in the presence of HcpR, but only for *hcp2* was possible to demonstrate that the mobility varies with the increased amount of protein. It was thus possible to prove the binding of HcpR to the promoter region of the *hcp2* gene.

Key Words: Hybrid Cluster Proteins, Hcp; *hcp1*; *hcp2*; *roo1*; *roo2*; HcpR; oxygen; hydrogen peroxide; nitric oxide; EMSA;

Lista de abreviaturas

APS – do inglês ammonium persulfate
ERO – Espécies Reactivas de oxigénio
H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio
O₂^{•-} - Radical anião superóxido
HO[•] - Radical hidróxilo
SOD – Superóxido dismutase
WT – *Wilde Type*
D.v.H – *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*
o/n – *Overnight*
pI – ponto isoelétrico
hcpR – do inglês *Hybrid cluster protein regulator*
hcp – do inglês *Hybrid cluster protein*
ftn – do inglês Ferritin
bcp – do inglês Bacterioferritin comigratory protein
ahpC – do inglês Alkyl hydroperoxide C
feoA – do inglês Ferrous iron transport
roo1 – do inglês rubredoxina oxigénio oxidorreductase 1
roo2 – rubredoxina oxigénio oxidorreductase 2
fld - do inglês flavodoxin
norV – do inglês NO reduction V
norR – do inglês NO reduction Regulator
PCR – do inglês Polymerase Chain Reaction
AP – do inglês Alkaline fosfatase
DIG – do inglês digoxigenin
PBS – do inglês Phosphate Buffered Saline
SRB – do inglês Storage Reconstitution Buffer
TE – Tampão de Eluição
TBE – Tris-borato-EDTA
TB – do inglês Transformation Buffer
TAE – Tris-Acetato-EDTA
LB – Luria-Bertani
LA – Luria Agar
SOB – do inglês Super Optimal Broth
U – unidades
SOC – Super Optimal broth with Catabolite repression
TSAS – do inglês Tryptic Soy Agar Sulphate
LS4D – do inglês defined Lacatate-Sulphate
ppm – partes por milhão
rpm – rotações por minuto
°C – grau Célsius
MCS – do inglês Multiple Cloning Site
i.e – do latim *id est; isto é*
ATP – Adenosina tri-fosfato
ADP – Adenosina di-fosfato
AMP – Adenosina mono-fosfato
e.g – do latim *exempli gratia*; por exemplo
G – Guanina
C – Citosina
Bp – do inglês Base pairs
NRB – do inglês Nitrate Reducing Bacteria
Glu – Glutamato
His – Histidina

Kb – kilobase
DTT – do inglês Dithiothreitol
TEMED – do inglês Tetramethylethylenediamine
SDS – do inglês Sodium dodecyl sulfate
X-Gal – do inglês 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside
IPTG – do inglês Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
DMSO – do inglês Dimethyl sulfoxide
DNA – Ácido desoxirribonucleico
RNA – Ácido ribonucleico
EMSA – do inglês Electrophoretic Mobility Shift Assay
PCR – do inglês Polimerase Chain Reaction
ORF – do inglês Open Reading Frame
OD₆₀₀ – do inglês Optical Density at de wavelenght 600
kD – kilo-Dallton
RT – do inglês room-temperature
dsDNA – do inglês double stranded DNA
Tris – t do inglês ris(hydroxymethyl) aminomethane
MQ – Milli-Q
CFU – do inglês Colony Forming Unit
dNTP – do inglês Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
EDTA – do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*
cDNA – do inglês complementary DNA
rRNA – do inglês ribossomal RNA
mRNA – do inglês mensager RNA
dATP – do inglês 2'-deoxyadenosine triphosphate
dCTP – do inglês Deoxycytidine triphosphate
dTTP – do inglês 2'-deoxythymidine triphosphate
dGTP – do inglês Deoxyguanosine triphosphate

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract.....	III
Lista de abreviaturas.....	IV
Índice	VI
Índice de Figuras.....	IX
Índice de Quadros	XII
Capítulo I – Introdução	1
1 - Desulfovibrio vulgaris Hildenborough – Background	2
1.1 - δ -proteobactérias	2
1.2 - Bactérias Redutoras de Sulfato (SRB)	3
1.3 - Desulfovibrio vulgaris Hildenborough	5
2 – Impactos	9
2.1 – Saúde	9
2.2 - Biocorrosão	10
2.3 – Biorremediação.....	11
3 – Stress.....	13
3.1 – Stress Oxidativo	13
3.1.1 – Oxigénio.....	14
3.1.2 – Peróxido de Hidrogénio.....	15
3.2 – Stress por óxidos nitrogenados	16
3.2.1 – Nítrico.....	16
3.2.2 – Óxido nítrico	17
4 - Hcp (Hybrid Cluster Protein)	18
4.1 – Estrutura.....	18
4.2 – Função.....	21
5 - HcpR (Hybrid Cluster Protein Regulator).....	22
Capítulo II – Objectivos.....	24
Capítulo III – Material e Métodos	26
1. Reagentes e Enzimas.....	27
1.1. Químicos.....	27
1.2. Enzimas modificadoras de DNA.....	28
1.3. Anticorpos	29
2. Estirpes Bacterianas.....	29
3. Plasmídeos.....	30
4. Kits	32
5. Equipamentos	32
6. Software.....	34
7. Meios e soluções	35
7.1. Crescimento <i>E.coli</i>	35
7.2. Crescimento <i>D. vulgaris</i> Hildenborough.....	36
7.3. SDS Page	37

7.4.	Purificação Proteica.....	37
7.5.	Isolamento de RNA	38
7.6.	<i>Electrophoretic mobility shift essay</i>	38
8.	Crescimentos Celulares.....	40
8.1.	Pré-inóculos de <i>E.coli</i>	40
8.2.	Stocks.....	40
8.3.	<i>E.coli</i> K-12 LMS2710 – Experiências de complementação	41
8.4.	<i>D. vulgaris</i> Hildenborough	42
8.4.1.	Stress de Oxigénio	43
8.4.2.	Stress de Peróxido de Hidrogénio	44
8.4.3.	Stress de Nitrito	44
8.4.4.	Stress de Óxido Nítrico.....	44
8.5.	Plaqueamentos	45
8.5.2.1.	CFU's	46
8.5.2.2.	Spot.....	46
9.	Técnicas de Biologia Molecular	46
9.1.	PCR.....	46
9.1.1.	Desenho de <i>primers</i>	47
9.1.2.	Amplificação a partir de DNA genómico.....	48
9.1.3.	Amplificação de confirmação de ausência de DNA no RNA isolado	49
9.1.4.	Amplificação a partir de cDNA.....	50
9.1.5.	PCR de colónias	51
9.2.	Digestões com enzimas de restrição	52
9.3.	Ligação	53
9.4.	Purificação de DNA	53
9.5.	Isolamento de Plasmídeos.....	54
9.6.	Electroforese em gel de agarose	54
9.7.	Quantificação de DNA e RNA	55
9.8.	Isolamento de DNA Genómico	55
9.9.	Indução de competência.....	56
9.9.1.	Método do TB	56
9.9.2.	Método do Cloreto de Cálcio	56
9.10.	Transformação pelo método do choque térmico.....	56
10.	Expressão, purificação e ensaios de determinação de concentração de proteína	57
10.1.	Expressão	57
10.3.	Quantificação.....	59
10.4.	Electroforese em gel de SDS-Page	60
11.	Electrophoretic Mobility Shift Assay.....	60
11.1.	Em gel de agarose.....	60
11.2.	Em gel de acrilamida não desnaturante	61
11.2.1.	Marcação DNA	61
11.2.2.	Ensaio de <i>Binding</i>	62
11.2.3.	Electroforese em gel de acrilamida não desnaturante.....	63
11.2.4.	Transferência DNA para membrana	64
11.2.5.	Revelação da membrana	65
12.	Isolamento RNA	65
13.	Produção de cDNA	67

Capítulo IV – Resultados e Métodos.....	68
1. Determinação do efeito do Oxigénio, Peróxido de Hidrogénio e Nitrato na viabilidade dos mutantes $\Delta hcp1$, $\Delta hcp2$ e $\Delta hcpR$ de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	69
1.1. Efeito do Peróxido de Hidrogénio na viabilidade dos mutantes $\Delta hcp1$, $\Delta hcp2$ e $\Delta hcpR$	69
1.2. Efeito do Oxigénio na viabilidade dos mutantes $\Delta hcpR$, $\Delta hcp1$ e $\Delta hcp2$	73
1.3. Efeito do Nitrito na viabilidade dos mutantes $\Delta hcp1$, $\Delta hcp2$ e $\Delta hcpR$	75
2. Contribuição dos genes <i>hcp1</i> , <i>hcp2</i> , <i>roo1</i> e <i>roo2</i> na defesa contra o stresse causado pelo óxido nítrico.	77
2.1. Ensaio de Complementação em E.coli K-12 LMS2710 com genes de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough (<i>hcp1</i> , <i>hcp2</i> , <i>roo1</i>)	77
2.2. Efeito do Óxido Nítrico na viabilidade dos mutantes $\Delta roo1$ e $\Delta roo2$	79
3. HcpR	81
3.1. Clonagem, Expressão e Purificação – pET28ahcpR	81
3.2. Binding do regulador HcpR às zonas promotoras dos genes <i>hcp1</i> , <i>hcp2</i> , <i>fld</i> , <i>feoA</i> e <i>ahpC</i>	86
3.3. Clonagem e expressão – pET24ahcpR	92
4. Avaliação da expressão dos genes <i>hcp1</i> , <i>hcp2</i> , <i>roo1</i> e <i>roo2</i> no mutante $\Delta hcpR$ de <i>D.vulgaris</i> Hildenborough	94
Capítulo V – Considerações Finais	97
Bibliografia	99

Índice de Figuras

Figura 1 – Árvore filogenética baseada nas sequências rRNA 16S das espécies de SRB.....	3
Figura 2 - Esquema ilustrativo dos processos envolvidos no ciclo do enxofre...	4
Figura 3 - Esquema ilustrativo da degradação da matéria orgânica complexa em ambiente anóxico na presença de sulfato.....	8
Figura 4 - Esquema representativo do processo de corrosão causado pelos redutores de sulfato.....	10
Figura 5 - <i>Clusters</i> metálicas das Hcp's.....	19
Figura 6 - <i>Fold</i> global das Hcps	20
Figura 7 - Árvore filogenética de máxima verosimelhança da família FNR/CRP de reguladores transcricionais.....	22
Figura 8– Crescimento anaeróbios do Wt e mutantes de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough expostos a 750µM de H ₂ O ₂	70
Figura 9 – Spots do Wt e dos mutantes de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough expostos 750µM de H ₂ O ₂	70
Figura 11 –Crescimentos anaeróbios do Wt e de mutantes de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough sob stress com 1mM de H ₂ O ₂	71
Figura 11 – Representação gráfica da contagem de CFU's realizadas ao Wt e aos mutantes de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough expostos a 1mM de H ₂ O ₂	71
Figura 12 – Crescimentos do Wt e de mutantes de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough sob stress induzido pelo oxigénio.....	73
Figura 13 – Representação gráfica da contagem de CFU's do Wt e dos mutantes de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough sob stress induzido pelo oxigénio.	74
Figura 15 – Crescimentos anaeróbios do Wt e de mutantes de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough expostos a 1mM de NaNO ₂	75
Figura 15 – Crescimentos do Wt e de mutantes de <i>D.vulgaris</i> Hildenborough sob stress de 2,5mM de NaNO ₂	75
Figura 16 – Electroforese em gel de agarose (1%) da amplificação dos genes <i>hcp1</i> , <i>hcp2</i> e <i>roo1</i> de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough e dos produtos de digestão de pUC18 <i>hcp1</i> , pUC18 <i>hcp2</i> e pUC18 <i>roo1</i>	77
Figura 17 - Crescimentos anaeróbios de <i>E.coli</i> K-12 LMS transformada com pUC18, pUC18 <i>hcp1</i> , pUC18 <i>hcp2</i> e pUC18 <i>roo1</i>	78
Figura 18 – Crescimentos anaeróbios do Wt e de mutantes de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough exposto a 100µM de DPTA Nonoato.	79
Figura 19 – Electroforese em gel de agarose (1%) a) da amplificação do gene <i>hcpR</i> e da reação de digestão de pET28 <i>hcpR</i>	82
Figura 20 – Electroforese em gel SDS-page (12%) da fração solúvel de crescimentos efectuados para teste de condições de expressão	82
Figura 21 – Electroforese em gel de SDS-page (12%) das amostras obtidas durante o processo de fracionamento celular	83

Figura 22 – Electroforese em gel de SDS-page (12%) de amostra da fracção celular do crescimento para expressão de HcpR optiizado.....	83
Figura 23 – Electroforese em gel de acrilamida (12%) das frações eluidas durante o processo de purificação e após concentração.....	84
Figura 24 – Electroforese em gel de agarose (2%) da amplificação das zonas promotoras dos genes <i>hcp1</i> , <i>hcp2</i> , <i>fld</i> , <i>feoA</i> e <i>ahpC</i>	86
Figura 25 – EMSA em gel de agarose (2%) das sondas <i>hcp1</i> e <i>hcp2</i>	87
Figura 26 – Teste de limite de detecção das sondas marcadas para EMSA.....	87
Figura 27 – EMSA em gel não desnaturante (6%) das sondas <i>hcp1</i> , <i>hcp2</i> , <i>feoA</i> , <i>fld</i> e <i>ahpC</i> e de teste de concentração de proteína com a sonda <i>hcp2</i>	88
Figura 28 - EMSA em gel de acrilamida não desnaturante das sondas <i>hcp1</i> , <i>hcp2</i> e <i>hcp2</i> RPL em diferentes tapões	89
Figura 29 - EMSA em gel de acrilamida não desnaturante de teste de quantidade de proteína e competição	90
Figura 30 – Electroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de digestão de pET24 <i>hcpR</i>	93
Figure 31 – Electroforese em gel de SDS-Page (12%) das amostras referentes aos crescimentos para expressão das células de <i>E.coli</i> BL21 (DE3) Gold.....	94
Figura 32 – Electroforese em gel de agarose (2%) do RNA total isolado a partir do Wt e do mutante $\Delta hcpR$; após incubação com DnaseI; do teste de ausência de DNA	95
Figura 33 – Avaliação dos níveis de expressão dos genes <i>hcp1</i> , <i>hcp2</i> , <i>roo1</i> e <i>roo2</i> no Wt e no mutante $\Delta hcpR$ de <i>D.vulgaris</i> Hildenborough.....	96

Índice de Quadros

Quadro 1 – Caracterização filogenética de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	6
Quadro 2 – Características gerais do genoma de <i>D. vulgaris</i>	7
Quadro 3 – Classes de Hcp existentes	20
Quadro 4 – Locais putativos de ligação para um factor do tipo FNR/CPR.....	23
Quadro 5 – Reagentes usados e seus fornecedores.....	27
Quadro 6– Enzimas de restrição usadas e respectivas sequências de reconhecimento	28
Quadro 7 - Estirpes celulares de <i>Escherichia coli</i>	29
Quadro 8 – Estirpes celulares de <i>D.vulgaris</i> Hildenborough.....	30
Quadro 9 – Plasmídeos	30
Quadro 10 – Kits	32
Quadro 11 – <i>Primers</i>	47
Quadro 12 – Composição das reações de PCR usando DNA genómico e as enzimas Taq DNA Polimerase e Phusion	48
Quadro 13 – Lista de DNA polimerases e genes por elas amplificados	49
Quadro 14 – Composição da reação de PCR para confirmação ausência de DNA usando Taq DNA polimerase.....	50
Quadro 15 – Composição da reação de PCR a partir de cDNA usando a Taq DNA	50
Quadro 16 – Composição da reação de PCR de colónias usando Taq DNA polimerase ...	51
Quadro 17 – Composição da reação de marcação 3' do DNA com ddUTPs usando a Terminal Transferase	61
Quadro 18 – Composição geral das reações de <i>binding</i> realizadas	62
Quadro 19 – Composição dos géis de acrilamida não desnaturantes	64
Quadro 20 – Condições expressão I e II.....	83
Quadro 21 – Condição de expressão III	83
Quadro 22 – Zonas promotoras amplificadas e seus tamanhos	86

Capítulo I – Introdução

1 - *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough – Background

Desde cedo que a extrema versatilidade apresentada por diversos microrganismos intrigou os primeiros microbiologistas. Desde aqueles que suportam condições de temperatura ou pressão extremas, até aos que parecem ter uma capacidade extremamente elevada de ocuparem (e até prosperarem) um grande número habitats, sendo estes, por vezes, diametralmente opostos do ponto de vista bioquímico. *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*D.v.H*) é um dos exemplos desta extrema versatilidade.

1.1 - δ -proteobactérias

O filo das proteobactérias, de longe o maior filo bacteriano, é conhecido pela sua grande diversidade, tanto morfológica como metabólica, característica esta que lhe valeu o seu nome (do grego Proteus, deus primordial do oceano capaz de mudar de forma + bakterion, pequeno bastão). Sendo composto exclusivamente por bactérias Gram-negativas, alberga a grande maioria de bactérias de interesse industrial, agrário e médico.

A título de exemplo da sua diversidade pode referir-se o facto de possuir microrganismos dispostos ao longo de um extenso gradiente de aerobicidade/anaerobicidade, albergando desde anaeróbios obrigatórios, passando por anaeróbios (e aeróbios) facultativos, até aeróbios obrigatórios. Dele fazem parte uma grande variedade de patógenos (*Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*), grande parte das bactérias responsáveis pela fixação de azoto e também bactérias redutoras de metais. Este é, portanto, um filo prolífero em particularidades, mas também em incógnitas e potencialidades.

Este filo, que tem como característica unificadora a sua homologia ao nível do rRNA 16S (RNA ribossomal 16S), subdivide-se em 5 classes: Alfa(α)-proteobactérias, Beta(β)-proteobactérias, Gama(γ)-proteobactérias, Delta(δ)-proteobactérias e Epsilon(ϵ)-proteobactérias. Embora as diferentes classes sejam de facto filogeneticamente distintas, não se pode dizer que uma determinada característica metabólica é filogeneticamente isolada, isto é, que seja característica de uma classe específica, sendo antes esta comum a elementos de diferentes classes. Como exemplo basta ver-se que existem bactérias nitrificantes (i.e capazes de sobreviver quimiolitotróficamente utilizando como dador de electrões compostos azotados reduzidos – NH_3 , NO_2^-) presentes em 4 classes diferentes e bactérias fototróficas (i.e usam a luz solar como fonte de energia no processo fotossintético) que se encontram dispersas por 3 classes^[77].

1.2 - Bactérias Redutoras de Sulfato (SRB)

Filogeneticamente, a maioria das SRB pertence às δ -proteobactérias, ao lado das bactérias redutoras de enxofre, *myxobacterias* e *bdellovibrios* [22][113]. Existem contudo, representantes das SRB noutros grupos (*Archaeoglobus* – Archae; *Thermodesulfobacterium* – bactéria hipertermófila; *Sulfurospirillum* e *Campilobacter* – ϵ -proteobactéria).

A predominância representativa (em termos de número de géneros) de SRB que pertencem ao filo das δ -proteobactérias é clara quando observamos uma representação filogenética deste grupo (Figura 1). Dele fazem parte organismos caracterizados pela sua capacidade de reduzir sulfatos a sulfuretos e que exibem uma grande variabilidade metabólica [10][23], sendo capazes de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos de

baixo peso molecular como dador de electrões (ácidos alifáticos mono- e dicarboxílicos, alcoóis, compostos aromáticos polares e hidrocarbonetos). As SRB foram mesmo as primeiras bactérias anaeróbias não-fotossintéticas onde foi observado a produção de energia (ATP) através de fosforilação acoplada à transferência de electrões[53].

Assim, as SRB obtêm energia para os seus processos acoplado a oxidação destes compostos orgânicos ou de hidrogénio à redução de sulfato (SO_4^{2-}) (aceitador terminal de electrões) a sulfuretos (H_2S , HS^-)[22] [23], funcionando o sulfato como aceitador final de electrões biológico (Eq. 1)[117]

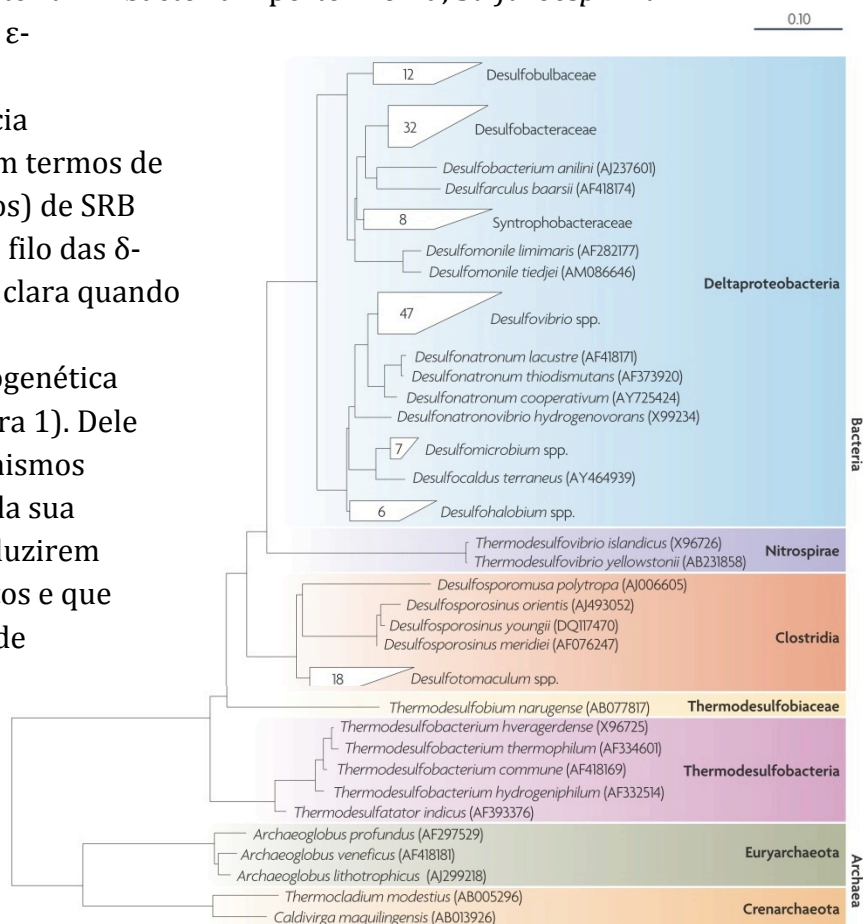
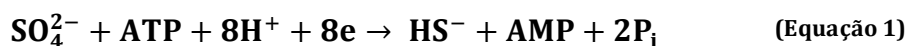


Figura 1 – Árvore filogenética baseada nas sequências rRNA 16S das espécies de SRB. Valores apresentados refletem o número de espécies contidas no grupo.(adaptado de Muyzer et al)

Os elementos desta classe encontram-se em habitats aquáticos e solos saturados de água, ricos em matéria orgânica e níveis suficientes de sulfato sejam eles naturais ou de origem humana (e.g águas marinhas superficiais, tapetes microbianos (*microbial mats*)^[6], esgotos, arrozais, tubagens petrolíferas^[85], etc.). Desempenham também um papel fundamental nos ciclos do enxofre (Figura 2) e do carbono (Biomineralização)^{[82][77]}.

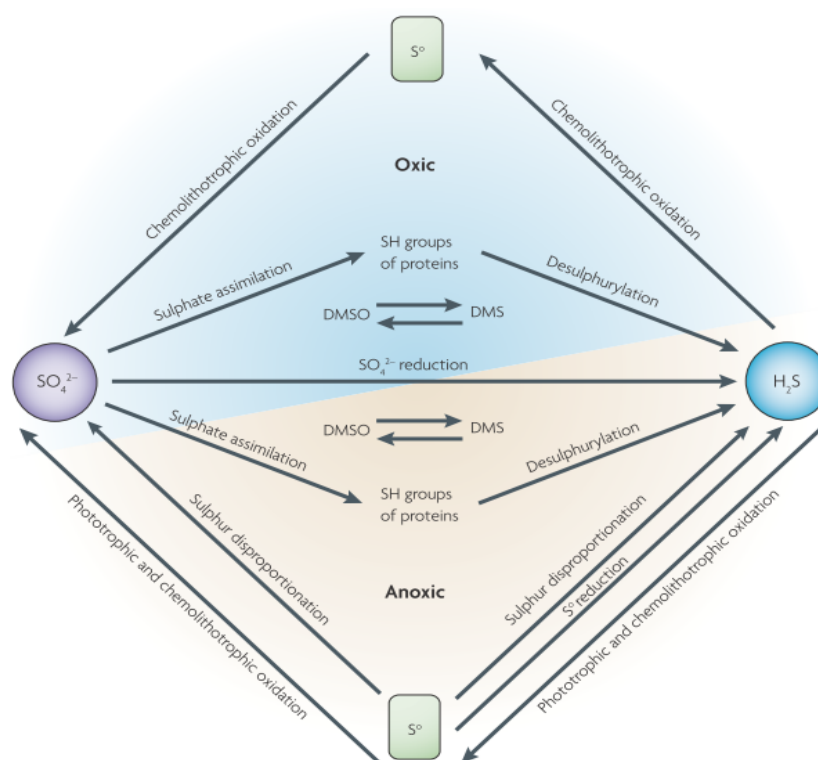


Figura 2 - Esquema ilustrativo dos processos envolvidos no ciclo do enxofre. (adaptado deMuyzer *et al*)^[82]

No ciclo do carbono, as SRB formam um consorcio microbiano que mineraliza completamente o carbono orgânico em anaerobiose, aproveitando o produtos de degradação por parte de organismos fermentativos.

Este grupo desempenha, então, um papel preponderante na degradação anaeróbia sempre que sulfato está presente e por vezes mesmo na sua ausência.

SRB não são apenas versáteis no seu uso de vários dadores e aceitadores de electrões, mas também podem crescer numa grande gama de condições ambientais^[13].

Culturas de SRB têm sido obtidas a temperaturas que vão desde psicrófilas a hipertermófilas, a concentrações de NaCl que vão deste condições de água doce até às hipersalinas^[48].

Elementos deste grupo foram já detectadas ou isoladas de sedimentos marinhos, fontes hidrotermais, vulcões de lama e são abundantes em tapetes microbianos hipersalinos, mesmo a concentrações saturantes de O₂. Detectados em habitats com valores de pH extremo como locais de drenagem de acido proveniente de minas ou lagos hipersalinos onde pH pode atingir 10.

O que se verifica, de facto, é que as SRB são detentoras de um grande número de genes que codificam vias envolvidas na resposta a stresses ambientais, o que contribui para a adaptação destes organismos a diversos habitats.

Embora as SRB tenham sido vistas durante muito tempo como anaeróbias estritas, estes organismos são capazes de lidar com exposições transientes de oxigénio no seu habitat natural (águas marinhas superficiais, esgotos, tubagens petrolíferas, equipamentos industriais, instalações de betão, etc.) e algumas espécies de *Desulfovibrio* foram relatadas como oxidando substratos orgânicos sob concentrações milimolares de oxigénio ^{[10][111]}

Na busca de biótopos com as características atrás referidas e necessárias à sua sobrevivência, foi observado que a sua atividade e biomassa tendem a aumentar não em zonas de anaerobicidade, mas sim em zonas óxicas (zonas oxigenadas). O número de SRB encontradas em ambientes óxicos indicam que estas são capazes de lidar com exposições temporárias a elevadas concentrações de oxigénio que podem atingir cerca de 1.5 mM ^[23]. Este comportamento foi racionalizado da seguinte forma: a densidade populacional e atividade das SRB dependem da disponibilidade de nutrientes orgânicos. Estes por sua vez resultam da produção primária ou da sedimentação de nutrientes provenientes de estratos superiores. Como os substratos ricos em nutrientes são rapidamente consumidos antes de atingirem os sedimentos profundos, a atividade e o número de SRB aumenta geralmente na direção dos sedimentos mais superiores, levando-as assim a habitarem ambientes óxicos. ^{[81][23]} .

Para além dos seus impactos mais que comprovados na indústria, as SRB poderão ter também algum impacto a nível de saúde humana, uma vez que uma percentagem significativa da população humana foi indicada como contendo grande número de SRB no intestino grosso.

O interesse industrial das SRB adveio do seu papel na corrosão de equipamento metálico e na contaminação de tubagens e reservatórios petrolíferos. A sua capacidade de reduzirem e acumularem metais pesados e radioisótopos^[52] atraiu a atenção para estes organismos como agentes biorremediadores.

1.3 - *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Em 1895, W.M. Beyerink reportou o isolamento a partir de um canal citadino de Delft, Holanda, de uma bactéria até então desconhecida que apelidou *Spirillum desulfuricans*. A contaminação de esgotos causava a acumulação de elevadas quantidade de sulfureto de hidrogénio durante o Verão, o que resultava num odor característico. Beyerink isolou em agár, colónias que eram distintas devido à precipitação de sulfato de ferro em seu redor, que lhes conferia um pano de

fundo preto. A mobilidade e morfologia de bastonete curvo descrita por Beyerink não deixa margem para dúvidas de que este tinha isolado e caracterizado a primeira espécie do género *Desulfovibrio*.^[110]

Desde então várias estirpes de *Desulfovibrio* têm sido descritas, entre elas *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough^[92] (Quadro 1)

Quadro 1 – Caracterização filogenética de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Classificação filogenética hierárquica da bactéria <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	
Domínio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Classe	Deltaproteobacteria
Ordem	Desulfovibrionales
Família	Desulfovibrionaceae
Género	<i>Desulfovibrio</i>
Espécie	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
Estirpe	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough

Desulfovibrio vulgaris Hildenborough foi inicialmente isolado de solo barroso perto de Hildenborough, Kent, Reino Unido em 1946. Como elemento das deltaproteobactérias e representante do grupo das SRB, apresenta um grande versatilidade metabólica e constitui, por isso mesmo, um organismo de grande interesse não só pelos seus impactos pejorativos como agente biocorrosivo, bem como, de um ponto de vista bastante mais benigno, como agente biorremediador.^[80]

Sendo uma SRB, *D. vulgaris* Hildenborough era encarado como sendo um anaeróbio estrito até surgirem dados que o sugeriam como aero-tolerante.

A colonização de vários locais de elevada toxicidade, devido a contaminação por metais pesados, bem como a sua capacidade de reduzir alguns deles metais, como Urânio (U(VI)) e Cromato (Cr(VI))^{[13][94]}, mesmo em locais cuja concentração de nitratos, nitritos e de sal era elevada foi também relatada. Estas condições são comuns em locais de contaminação, mas são também inibitórias do crescimento da maioria dos organismos.

Desulfovibrio vulgaris Hildenborough foi a primeira SRB a ter o seu genoma completo sequenciado. Isto abriu caminho para estudos genómicos funcionais (Quadro 2). *D. vulgaris* foi também o primeiro a ser geneticamente manipulado através de conjugação e o segundo a ser modificado por mutagenesis de troca de marcador (após *Desulfovibrio fructosovorans*).^[61]

Quadro 2 – Características gerais do genoma de *D. vulgaris*

	Cromossoma	Mega-plasmídeo
Tamanho (bp)	3,570,858	202,301
% G+C	63.2	65.7
Genes codificantes previstos	3,395	152
Percentagem codificante	86.4	85.0

Entre as SRB, os representantes do género *Desulfovibrio* são os mais fácil e rapidamente crescidos em cultura^[61], apresentando-se *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough como um organismo para o qual as ferramentas genéticas, bioquímicas e genómicas necessárias à investigação dos mecanismos de defesa foram já desenvolvidas e, na medida dos possíveis, optimizadas^[93].

Todas estas características tornaram *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough um modelo de extrema relevância e um alvo de alto interesse para estudos fisiológicos^[94], justificando a adopção deste organismo como modelo para o estudo das SRB.

D. vulgaris Hildenborough pertence a um grupo de oxidantes incompletos de lactato^[22], onde o acetato é frequentemente o produto final da oxidação enzimática de ácidos orgânicos e alcoóis, funcionando posteriormente como dador de electrões à redução de sulfato.

Fumarato, lactato ou piruvato, etanol, malato, bem como componentes do petróleo bruto e o ferro metálico, podem funcionar como dadores de electrões para a redução do sulfato. Este organismo é também capaz de crescer quimiolitotróficamente utilizando H₂ como dador de electrões para a redução de sulfato, necessitando desta forma de acetato e CO₂ como fontes de carbono^{[48][91]}.

Como o fluxo electrónico a partir da oxidação do lactato com a redução do sulfato origina um crescimento robusto de *Desulfovibrio*, a maioria dos dados que estão disponíveis foram obtidos a partir de células crescidas neste substrato^[61].

Este substrato preferencial (o lactato) é oxidado a piruvato por uma desidrogenase sofrendo este, posteriormente processos de oxidação adicionais.

Como já referido, as SRB utilizam o sulfato como aceitador final de electrões. Era então aceite que o ATP formado durante este processo era a fonte de energia nestas bactérias. Posteriormente foi observado que as enzimas responsáveis pela redução do sulfato eram citoplasmáticas. Assim, sendo a membrana impermeável a este composto, seria necessário um passo adicional quer

permitisse a difusão do sulfato para o citoplasma. Foi então descoberto que o sulfato tem de ser previamente ativado, e só depois se torna passível de atingir a fase citoplasmática. Com esta descoberta foi racionalizado que para a ativação do sulfato ocorrer, duas moles de ATP, formadas durante a oxidação de 2 moles de lactato, seriam gastos. Portanto, energia para suportar o crescimento deste organismo teria de ser fornecida por um mecanismo alternativo. A ciclização do hidrogénio apresentou-se, então, como uma hipótese para a produção de energia nas SRB.

Esta alternativa consiste num modelo quimioestático para a transdução de energia a partir do lactato. Neste modelo os prótons e electrões provenientes do lactato e do piruvato, são transformados em hidrogénio por uma hidrogenase citoplasmática, difundindo posteriormente para o periplasma onde é reoxidada por uma hidrogenase periplasmática, criando assim um gradiente protónico que pode ser usado para síntese de ATP adicional. [61][118]

A separação física da oxidação de hidrogénio e redução de sulfato, cria um gradiente protónico que é consumido por um complexo ATP sintase.

O investimento de duas ligações de fosfato de elevada energia necessárias para a ativação do sulfato seria então recuperado por fosforilação de ADP a ATP induzida por prótons no nível do substrato. (Figura 3)

D. vulgaris Hildenborough ativa diferentes vias de resposta que são específicas a uma larga gama de stresses. Análise genómica reporta também um número elevado de reguladores de resposta envolvidos na transdução de sinal. O genoma de *D.v.H* codifica putativamente 64 sensores de histidina cinase e 72 reguladores de resposta^[118], elementos estes que são relacionados com a detecção e integração de estímulos ambientais. Esta grande diversidade provavelmente reflete a alta flutuação e diversidade de stresses que as SRB enfrentam nos ambientes em que crescem^[100].

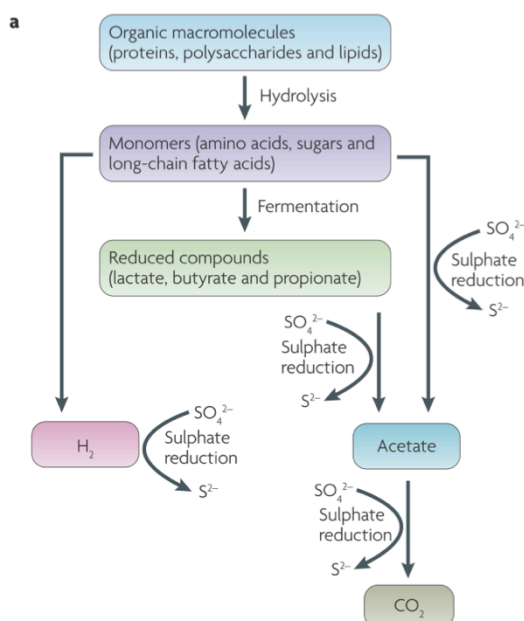


Figura 3 - Esquema ilustrativo da degradação da matéria orgânica complexa em ambiente anóxico na presença de sulfato. (Adaptado de Muyzer *et al*^[82])

Isto torna também *D.v.H* um modelo de extremo interesse e potencial no que diz respeito ao estudo dos mecanismos de defesa a uma panóplia de condições de stress.

2 – Impactos

Para além de organismos de elevada importância no que diz respeito aos ciclos naturais do enxofre e do carbono, as SRB apresentam também uma preponderância antropológica significativa no que diz respeito à saúde, biocorrosão e biorremediação.

2.1 – Saúde

Na saúde, *D.vulgaris* parece ter também um papel significativo uma vez que tanto *D. vulgaris* como outras espécies de *Desulfovibrio* parecem estar relacionadas com casos de bacterémia primária e de infecções abdominais (como abscessos e colites)^[30]. A sua má correlação, até à data, com complicações médicas surge do crescimento lento associado a estes organismos bem como das condições especiais de crescimento que lhe são inerentes (e.g. anaerobiose, sulfatos). Isto resultava numa ausência representativa quando se efetuavam as culturas diagnosticantes rotineiras. Tal ausência poderia ser na realidade fictícia, uma vez que perante maior taxa de duplicação dos outros organismos de crescimento mais rápido, o seu verdadeiro impacto era subestimado^[42].

Encontra-se também reportado o potencial papel de *Desulfovibrio* no autismo retrógrado (autismo em que a criança se desenvolve normalmente até aos 18 meses aproximadamente, regredindo nesta altura, adquirindo as características de autismo). Os autores sugerem uma relação direta entre maior representatividade do género *Desulfovibrio* na flora intestinal e a severidade dos casos de autismo. Estes mostram que o tratamento com antibióticos (especialmente os de maior toxicidade para o género *Desulfovibrio*) regride as características de autismo, revertendo a criança a um estado normal^{[28][29]}, mesmo que temporariamente^[99]

O impacto médico-social deste género parece ser mais significativo do que o pensado até recentemente.

2.2 - Biocorrosão

Como foi já referido, inerente à atividade metabólica das SRB está a biocorrosão^[47]. Biocorrosão trata-se de corrosão como resultado da atividade metabólica de determinados microrganismos, também denominada MIC (*Microbial-Influenced Corrosion*)^[85]. Este tipo de corrosão está, frequentemente associada à formação de biofilmes^{[17][55][47]}.

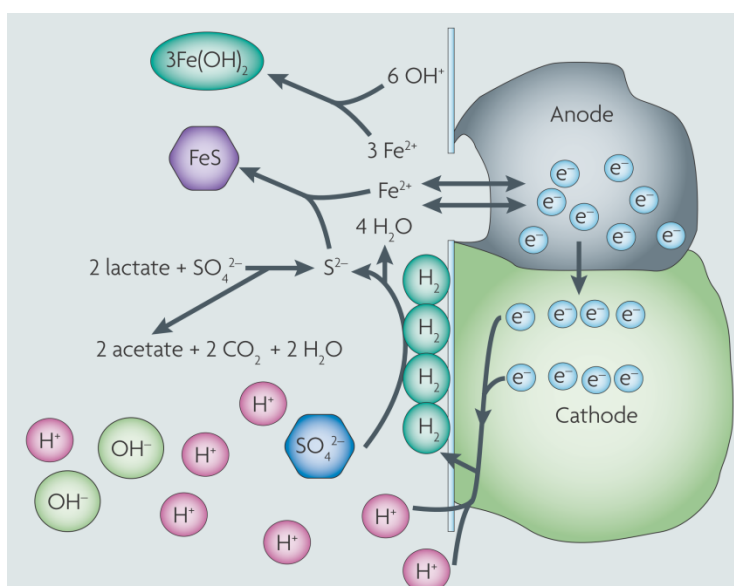


Figura 4 - Esquema representativo do processo de corrosão causado pelos redutores de Sulfato. (Adaptado de Muyzer *et al*^[82])

O interesse nas SRB tem estado ligado ao seu papel na biocorrosão de instalações de metais ferrosos na indústria do petróleo e de estruturas de cimento em sistemas de recolha de águas residuais^[85].

O ácido sulfúrico é usado em muitas indústrias o que resulta na ocorrência de sulfatos nas águas residuais. O sulfato, para além de ser já ele próprio tóxico, inodoro e corrosivo, é ainda um substrato essencial à proliferação das SRB ^[83]. Estas por sua vez têm associada a redução do sulfato a sulfuretos de hidrogénio como mecanismo de obtenção de energia. Os sulfuretos são também reativos e tóxicos, sendo responsáveis pela corrosão de metais férricos em ambientes anaeróbios (Figura 4).

Um exemplo clássico do efeito negativo das SRB é o seu impacto negativo na indústria petrolífera. Estas causam corrosão de maquinaria de perfuração e bombeamento e de tanques de acondicionamento. Causam também o “souring” de petróleo pela produção de sulfuretos e entupimento de maquinaria e poros rochosos com biomassa e precipitados de sulfureto.^[20]

A causa mais comum desta praga na indústria do petróleo é a inundação dos reservatórios petrolíferos com água do mar, método este que é frequentemente usado para aumentar a recuperação do petróleo a partir do reservatório. Contudo, a este processo, está associado o “souring” dos reservatórios devido à produção microbiana aumentada de sulfureto de hidrogénio que reduz a qualidade do crude e causa a corrosão das tubagens e maquinarias usadas na sua extração e acondicionamento^{[55][20][67]}. Isto acontece porque a água do mar tem uma elevada concentração de sulfatos (28mM)^[48] o que proporciona uma maior

proliferação e atividade de todos os organismos que utilizem este composto como aceitador final de electrões da sua cadeia respiratória (as SRB).

O controlo deste tipo de população vem desde longa data a ser estudado sem grande sucesso^{[20][84]}. O método presentemente mais preponderante baseia-se no conhecimento de que o crescimento das SRB pode ser inibido, por elevação do potencial redox do meio, por compostos como os intermediários da redução do nitrato, óxido nitroso e óxido nítrico^[20]. Assim a utilização deste tipo de compostos apresenta-se como uma possível solução.

Contudo, tem sido evidenciado em dados recentes que a remediação com nitrato, na ausência de nitrate reducing bacteria (NRB) não produz o efeito desejado^[84]. É necessária uma população de NRB ativa. Isto limita claramente a utilização deste tipo de compostos. Assim, também o estudo do comportamento deste organismos face a compostos nitrosos se apresenta como uma mais valia.

2.3 – Biorremediação

Ao contrário do que acontece com os compostos orgânicos, os compostos metálicos não são biodegradáveis. Contudo, um grande número de contaminantes metálicos e semimetálicos são ou menos solúveis ou mais voláteis quando se encontram no seu estado de oxidação mais baixo^{[76][82]}.

Neste contexto, organismos capazes de proceder à redução de compostos do tipo a trás referidos, podem ser utilizados como agentes biorremediadores uma vez que como resultado da sua ação metabólica estes compostos podem ser precipitados (se virem a sua solubilidade diminuída) ou volatilizados resultando numa eliminação efetiva dos ditos compostos metálicos ou semimetálicos do meio.^[76]

Obviamente, para serem capazes de proceder a esta descontaminação, todas as condições (nutricionais, atmosféricas, electrolíticas, etc.) necessárias para a atuação das vias metabólicas responsáveis pelas reações que têm como consequência a redução destes elementos tóxicos têm de ser respeitadas. Contudo, estes microrganismos ocupam com frequência nichos restritos, que o são devido às suas características bastantes particulares. O problema surge da sua necessidade de um ambiente específico. Uma vez que o microrganismo está adaptado à sobrevivência nas condições existentes naquele nicho específico, o seu crescimento em outros meios pode ser dificultado ou mesmo impedido. Alternativamente, pode também ocorrer que a via metabólica de utilidade para o propósito designado esteja inativada nas condições em que a sua aplicação era, do ponto de vista antropológico, vantajosa.

Imagine-se uma situação em que um determinado organismo tem a capacidade de acumular e reduzir uma grande quantidade de mercúrio, um elemento metálico extremamente tóxico. Contudo, este organismo fictício apresentava uma temperatura mínima de crescimento de 200°C, não havendo

qualquer crescimento a uma temperatura inferior à referida. Uma vez que os locais de normal contaminação por parte deste tipo de metal pesado (com frequência rios e riachos) não apresentam este tipo de condições, o potencial deste microrganismo (por mim idealizado) como biorremediador estaria extremamente limitado devido à sua exigência metabólica, aqui determinante. Esta situação fictícia retrata uma das problemáticas que circunda a biorremediação. Existe então a necessidade de explorar a plasticidade de adaptação ambiental e metabólica destes microrganismos de forma a melhor compreender a sua aplicabilidade e idealmente, recorrendo à engenharia genética, colmatar as deficiências observadas de forma a criar um biorremediador de maiores potencialidades ambientais.

Estudos posteriores mostraram a capacidade de algumas SRB reduzirem oxianíons metálicos^[39]. Estes oxianíons, cuja fórmula geral é $A_xO_y^{z-}$, em que A é um qualquer átomo (no caso dos oxianíons metálicos, como o próprio nome indica, será um átomo metálico) e o O representa um átomo de oxigénio, são transformados de formas solúveis a formas insolúveis. Este processo é então de grande utilidade na biorremediação de metais pesados tóxicos e radioisótopos

Este seu papel biorremediador deve-se a 3 factos^{[53][69]}:

- A actividade metabólica das SRB aumenta o pH, causando a precipitação de metais tóxicos como cobre (II), níquel (II) e cádmio (II) em ambientes aquáticos ácidos.
- Sulfatos metálicos (como cádmio, cobalto, cobre, ferro, níquel e zinco) são altamente solúveis, mas os sulfuretos metálicos correspondentes têm baixa solubilidade. Assim, por redução pelo sulfato, os metais podem ser precipitados, recuperados e reutilizados.
- Estes organismos possuem enzimas capazes de reduzir directamente oxianíons metálicos e radioisótopos, podendo mesmo alguns usá-los como aceitador final de electrões para o crescimento.

Alguns dos radioisótopos de maior preponderância na contaminação ambiental são crómio (Cr(VI)) e o urânio (U(VI))^{[98][70]}.

O crómio surge das descargas de efluentes de fábricas de curtição, cromagem, de preservação de madeiras e preparação de ligas, promovendo a contaminação de vários aquíferos^[86]. Este elemento em elevadas concentrações é tóxico, mutagénico, carcinogénico e tetragénico^[102]. É um agente redutor forte (potencial de oxidação 1.3 V) que na sua forma oxidada é altamente solúvel^[76], sendo de todo o interesse encontrar um biorremediador capaz de fazer a sua destoxificação ^[72].

O urânio é um elemento bastante prolífero, provindo não só da produção de armas, atividades relacionadas com a energia nuclear e fins científicos, mas também como subproduto de algumas atividades mineiras e mesmo da combustão de combustíveis fósseis. Embora seja encontrado naturalmente, a

atividade humana aumenta a sua quantidade. Importante visto ser tóxico e radioativo. Na sua forma reduzida é também menos solúvel^{[13][72][70]}.

Encontra-se, assim, bem documentada a capacidade das SRB precipitarem redutivamente metais redox através de vias enzimáticas^[70] ou simplesmente precipitar metais sob a forma de sulfuretos metálicos^{[13][38][71]}. A capacidade de redução enzimática de oxianíons metálicos solúveis tem sido especialmente observada em *Desulfovibrio* spp ^{[13][68]}, *D.v. H* inclusive ^{[76][71]}. Esta redução foi atribuída ao citocromo C3, que se tornou no primeiro modelo para a redução dissimilatória anaeróbia de metais e para a biomineralização. Assim, o modelo atual descreve uma rede de citocromos como fornecendo electrões para a redução de radioisótopos, como Cr(VI) e U(VI), sendo o citocromo c3 o mais preponderante no processo^{[76][88][71]}

De forma a aplicar com sucesso esta capacidade das SRB de imobilizarem metais pesados e radioisótopos, é necessário compreender a sua resposta a todos os factores ambientais comuns nas zonas contaminadas. Neste grupo incluem-se não só os compostos a destoxificar mas também outros compostos que contaminem a área e sejam potencialmente adversos a proliferação microbiana (e.g nitratos, nitritos, sais, etc.).

Com todos estes dados, apoiados pelo facto de se encontrarem SRB em comunidades microbianas responsáveis pela redução de metais pesado mesmo em ambientes extremos^{[13][58]} o potencial imobilizador de metais pesados e radioisótopos das SRB tem suscitado bastante interesse.

3 – Stress

Existem atualmente estudos intensivos na resposta a todo o tipo de stress em modelos tradicionais e instituídos como *E.coli*, *B.subtilis* e *S.cerevisae*. Contudo, sem uma amostragem fisiológica e filogeneticamente diversa é impossível determinar mecanismos de stress universais. Isto foi constatável pela descoberta de inúmeros sistemas regulatórios que não estão presentes nos organismos modelo.^{[116][118]}

Dentro dos vários tipos de stress os mais preponderantes no que diz respeito as SRB, e assim para *D.v.H* como modelo deste grupo, são sem sombra de dúvida o stress oxidativo e o stress pelos óxidos nitrogenados.

3.1 – Stress Oxidativo

O termo stress oxidativo é frequentemente usado mas raramente é definido. Helmut Sies definiu-o como o desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes, a favor dos oxidantes, levando a um potencial dano. Stress oxidativo refere-se à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e às defesas antioxidantes.

Todas as definições implicam os oxidantes como causando dano. ROS englobam radicais como o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radicais alcoóis (RO^{\bullet}), radicais peróxido (ROO^{\bullet}) e o radical hidroxilo ($\bullet OH$), bem como formas não radicalares como H_2O_2 ou outros hidroperóxidos ($ROOH$). ROS, principalmente devido à sua forma radicalar, podem danificar todo o tipo de moléculas. O melhor exemplo é a produção de $O_2^{\bullet-}$ por células fagocitárias como bactericida.^{[118][8]}

Dentro do stress oxidativo apresentam-se dois tipos de stress de maior impacto para as SRB, perante o seu perfil anaeróbio: o stress pelo O_2 e pelo H_2O_2 .

3.1.1 – Oxigénio

As SRB e com elas *Desulfovibrio* spp, como já referido, são classificados como anaeróbios estritos, sendo de facto o seu crescimento em anaerobiose total.

^{[35][23]} Nesta medida o stress pelo O_2 é obviamente o de maior impacto, tornando assim importante o estudo da resposta destes organismos a este tipo de stress.

Cada vez mais dados vêm afirmar que diversas SRB são capazes de suportar exposições transientes ao O_2 no seu habitat natural, e que, inclusive a sua atividade metabólica em zonas óxicas de vários biótopos incluindo sedimentos de água doce e marinha, tem sido frequentemente relatada como superior àquela em zonas anóxicas vizinhas. Atividade atribuída às SRB é detectada mesmo nas camadas fototróficas superiores dos tapetes microbianos (zonas de elevada concentração de O_2) ou em zonas periodicamente expostas ao oxigénio.^{[65][6]}

Reforçando estas observações, aerotolerância é também observada em culturas puras.

Assim, embora oxigénio a altas concentrações seja tóxico para as SRB, uma vasta gama de sensibilidades é observada.

Crescimento de *Desulfovibrio* spp. foi observado em zonas que são regularmente ou periodicamente expostas ao oxigénio. Foi também observado que num gradiente, *Desulfovibrio vulgaris*, em vez de se localizar na zona anóxica, que seria o espectável para um anaeróbio obrigatório, este localiza-se em zonas em que o oxigénio está presente, tendo sido inclusive observado a migrar em direção a uma baixa concentração de O_2 (0,02-0,04% (v/v))^[116].

Contudo, este não acopla o seu crescimento à respiração com O_2 e mesmo quantidade baixas de oxigénio afectam o seu crescimento, mesmo que este seja capaz de sobreviver a longos períodos de exposição. O seu crescimento é, portanto, óptimo em condições totalmente aneróbias, mas não é de forma alguma impedido por ambientes microaeróbios^[19].

Tendo *D. vulgaris* o comportamento descrito, muitos estudos se focaram no esclarecimento dos seus mecanismos de proteção contra o stress oxidativo, pois apenas um mecanismo robusto e de grande eficiência explicaria esta

adaptabilidade, aparentemente díspar com as suas condições óptimas de crescimento^[23].

A devastadora maioria das SRB possui vários mecanismos de proteção contra o stress oxidativo, tais como proteínas únicas de *scavenging* de ROS. Entre eles contam-se uma superóxido redutase (Sor), uma superóxido dismutase (Sod), uma catalase (Kat) e uma rubredoxina oxidoredutase (Rbo). Esta última faz parte de um operão que inclui o gene que codifica para uma rubredoxina (*rub*)^[14] e o gene que codifica para uma rubredoxina oxigénio oxidoredutase (*roo*), tendo a Roo de *D.gigas* sido descrita por Rodrigues et al como sendo uma redutase de oxigénio bem como uma redutase de óxido nítrico^{[97][103][104][109]}. As Rbo, Roo e Sor são conservadas nas SRB, permitindo um *scavenging* de ROS sem a regeneração de oxigénio intra celular.^{[33][81][34]}

Pensa-se então que *D.v.H* lida com baixos níveis de oxigénio e stress oxidativo fraco usando como defesa basal enzimas destoxicantes de oxigénio constitutivas (Sod, Kat, Sor, Rbr e Rbo) apoiadas por enzimas adicionais pertencentes ao regulão da PerR (repressor de resposta ao peróxido de hidrogénio), tais como a AhpC e a Rdl.^{[33][73][19]}

Estudos de como as SRB lidam com a exposição ao oxigénio molecular e a ROS fornecem informações importantes sobre a ecologia destas bactérias, bem como sobre o seu uso prático na biorremediação.

Foi observado por análise da expressão genética de *D. vulgaris* que baixas concentrações de O₂ (0.1%) resultam em perturbações suaves na expressão. Ocorre uma pequena alteração de expressão génica com ausência de alterações nos genes referentes ao metabolismo central. Isto pode sugerir que durante o crescimento normal de *D. vulgaris* existem já quantidades adequadas de enzimas necessárias à resposta a baixos níveis de oxigénio.

Um aumento e uma resposta temporal concertada da expressão do regulão *perR* em *D. vulgaris* quando exposto a baixas concentrações de O₂ é também consistente com uma resposta fisiológica a uma condição que é frequentemente encontrada no ambiente natural^[81].

Contudo, a exposição ao O₂ causa alterações morfológicas e inibição da redução de sulfato. Isto mostra que o oxigénio é de facto prejudicial para estes organismos.^[23]

3.1.2 – Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o superóxido têm sido foco de investigação central da biologia dos ROS nos últimos anos.

Concentrações elevadas de H₂O₂ resultam em dano celular, refletindo-se no dano de moléculas celulares tais como DNA, lípidos e proteínas^[10].

O seu bem-estabelecido papel como molécula antibacteriana utilizada pelo fagossoma bem como de agente destabilizador do genoma levou à caracterização destas moléculas como agente destrutivo, embora hajam já dados que mostrem esta molécula como sinalizador intracelular^{[78][44][60]}.

Foi observado que stress com 1mM de H₂O₂ resulta na indução de cerca de 485 genes de *D. vulgaris*. Verifica-se que nesta gama tanto o stress pelo O₂ como pelo H₂O₂ originam respostas de expressão génica qualitativamente semelhantes^[112].

D. vulgaris apresenta também no seu genoma uma grande número de genes que se antecipa que estejam relacionados com a redução de peróxido de hidrogénio. Neste contexto foi definido um regulão putativo PerR. Deste regulão fazem parte um subconjunto de genes relacionados com a redução do peróxido (*ahpC*, *rbr*, *rbr2*, *rdl* e um gene codificando uma proteína hipotética) ^{[33][94][10]}

3.2 – Stress por óxidos nitrogenados

Na categoria de óxidos nitrogenados entram não só as conhecidas espécies reativas de azoto como o óxido nítrico (NO) como também os nitritos (NO₂⁻) e nitratos (NO₃⁻). Enquanto o óxido nítrico é mais conhecido pelo seu papel como agente biocida, os nitritos e nitratos são mais conhecidos pelo seu papel de contaminantes ambientais^[94].

Estes compostos apresentam relevância a nível industrial pois encontram-se com frequência em elevada concentração em vários locais contaminados por metais pesados e radioisótopos^[52]. Isto torna-os um factor importante a ter em conta quando se pensa num processo de biorremediação.

Os óxidos de azoto representam um elemento stressante de elevada importância, não só pelo seu papel como contaminantes ambientais como pelo sua utilização como agente antimicrobiano.

3.2.1 – Nítrico

A contaminação de nitratos pode surgir como um stress particularmente importante e específico para as SRB, uma vez que foi demonstrado que estes inibem especificamente *in situ* a redução de sulfato. ^[50]

Embora a contaminação por nitrato seja mais comum, pensa-se que será, não o nitrato, mas sim o nitrito, que é um intermediário que se acumula durante o processo de redução de nitratos, o elemento diretamente responsável pela inibição da redução de sulfatos, e assim, pela sua toxicidade^{[55][20]}. Apoiando esta hipótese foi verificada a inibição da sulfato-redutase dissimilatória, proteína esta que é uma enzima chave na via da redução do sulfato, por parte do nitrito.

Este tipo de contaminação apresenta-se então como um obstáculo particularmente preponderante na biorremediação recorrendo às SRB.^[51]

Como foi já referido, para o uso das SRB como elemento biorremediador eficaz, é importante determinar o seu comportamento face aos factores adversos frequentemente encontrados nos locais contaminados. Assim, a resposta deste grupo a este tipo específico de stress é importante.

D. vulgaris tem sido usado com frequência como organismo modelo no estudo da resposta das SRB a este tipo de stress.

Durante os vários estudos sobre o efeito a nível da expressão celular deste composto, as Hcp's (*Hybrid Cluster Proteins*) surgem consistentemente como sendo induzidas.

3.2.2 – Óxido nítrico

O NO apresenta-se como um composto de elevada reatividade, uma vez ser capaz de atravessar membranas biológicas sem necessidade de mecanismo de transporte específico, difundindo rapidamente entre e dentro das células, reagindo com outros radicais bem como com centros metálicos. ^{[40][58]}

NO ou as espécies reativas de azoto (e.g. peroxinitrito) podem afectar todo o tipo de biomoléculas como DNA (não diretamente, mas por desaminação das bases de DNA (e.g. guanina, citosina)), lípidos e proteínas (afecta tióis, resíduos de aminoácidos aromáticos, radicais tirosil e triptofanil e também centros metálicos) ^{[31][32]}

O NO apresenta-se então como:

- contaminante ambiental, surgindo como subproduto do metabolismo de bactérias desnitrificantes
- Agente antimicrobiano utilizado pelo sistema imunitário dos mamíferos como parte de uma resposta do hospedeiro à infecção. Isto torna-se relevante no caso de organismos potencialmente patogénicos.

Várias enzimas redutoras desta classe de compostos (óxidos de azoto) têm sido descritos em *Desulfovibrio* spp. Rodrigues et al, no seu estudo deste tipo de stress em *D. gigas* mostrou que a enzima Roo, para além de atividade de oxigénio redutase apresenta também atividade redutase de óxido nítrico^{[97][108]}, tendo mostrado complementação de um mutante de *E.coli* para o gene *norV* (gene que codifica a FIRd de *E.coli*, uma flavorubredoxina caracterizada como reduzindo NO) que era, portanto, incapaz de sobreviver em meio com quantidades milimolares de NO^[97].

D. vulgaris Hildenborough possui no seu genoma dois genes que codificam duas destas proteínas: a Roo1 (*Dvu2014*) e a Roo2 (*Dvu3185*) que se pensa estarem também envolvidas neste tipo de stress^{[57][97]}.

O papel deste tipo de stress no ciclo de vida de organismos redutores de sulfato é assim de extrema importância.

4 - Hcp (Hybrid Cluster Protein)

Sendo uma enzima redox incomum, a Hcp tem sido extensivamente estudada em aeróbios estritos (espécies de *Desulfovibrio*) e anaeróbios facultativos (*E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Shewanella oneidensis*) onde é induzida maioritariamente durante o stress com nitrito ou nitrato^[1], sugerindo um papel no metabolismo do nitrogénio.

4.1 – Estrutura

Esta proteína foi descoberta por Hagen em 1989, tendo ele observado a sua co-purificação com a hidrogenase solúvel de *D. vulgaris*. Com base em análise espectroscópica de EPR, o autor definiu a existência de um grupo prostético de ferro- enxofre, que possuía uma estrutura e comportamento redox nunca antes vistos^[46]. Este grupo prostético continha um núcleo, segundo pareciam sugerir os dados espectroscópicos, [6Fe-6S]. A estrutura prismica deste hipotético núcleo valeu-lhe o nome de *prismane protein*. Análises espectroscópicas, de biologia molecular e bioquímicas posteriores pareciam estar em concordância com a hipótese sugerida ^{[90][106][89]}

Em 1992, Moura et al, através da análise dos espectros de Mössbauer a baixa temperatura obtidos na análise desta proteína isolada de *D. desulfuricans* (ATCC 27774) sugere a presença não de um, mas sim de 2 núcleos [6Fe-6S]^[79].

Mais tarde, e à luz destes novos resultados, Arendsen e o seu grupo (incluindo Haven), procederam a determinação da estrutura cristalográfica desta "proteína-prismica" a fim de esclarecerem esta incongruência observada por espectroscopia de Mössbauer. O que estes descobriram levou-os a reformularem a teoria assente. Albergando já os dados que descreviam não um mas sim dois núcleos ferro-enxofre, repropuseram a sua hipótese, sugerindo dois grupo prostéticos tal como era sugerido não só pelos dados bibliográficos (Moura, 1992) como pelos seus próprios dados.

A revelação deste estudo levou à necessidade de uma renomeação desta proteína pois a estrutura cristalográfica obtida por difração de raio-X mostrou que os *clusters* que lhe conferiam o nome não apresentavam núcleos de [6Fe-6S] mas sim núcleos contendo quatro átomos de ferro.

Um dos *cluster* foi caracterizado como um núcleo [4Fe-4S]²⁺ e aceitador de 1e⁻ formando um *cluster* do tipo cubano (hidrocarboneto com estrutura cúbica) denominada *cubane-cluster* comum (Figura 5), mas contendo um novo motivo de ligação de cisteínas.

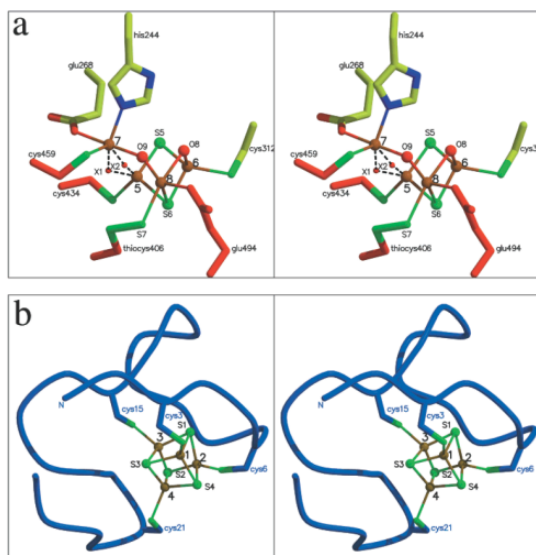


Figura 5 - Clusters metálicas. (a) Cluster híbrido com átomos de ferro, enxofre e oxigénio representados a castanho, verde e vermelho, respectivamente. (b) A cubane-cluster com átomos de enxofre e ferro a verde e castanho. (adaptado a partir de Cooper et al^[18])

O outro *cluster*, este sim completamente novo, possuía um novo centro a que apelidaram de *cluster* híbrido (Figura 5) contendo um núcleo [4Fe-3S-2O] aceitador de $3e^-$ que se encontra na interface de 3 domínios proteicos e é coordenado por 7 aminoácidos (4 Cys, 2 Glu e 1 His)^[56]. Este *cluster*, magneticamente, comporta-se como uma entidade única, comportamento este resultante do acoplamento de quatro iões $Fe^{3+/2+}$ de elevado *spin*. A classificação errónea deste núcleo foi atribuída a um conjunto de factores fortuitos, mas principalmente à determinação experimental errónea da sua massa molecular devido a uma estrutura

incomum (52kD e não os reais 60kD que foram posteriormente determinados quando o gene que a codifica foi identificado e transcrito). Este erro influenciou a determinação estequiométrica da quantidade de ferro por molécula de proteína resultando numa estequiometria de 6.3 ferros por proteína^{[64][3][18]}

O *cluster* híbrido possui quatro estados de oxidação que vão deste o estado mais oxidado, em que contém quatro Fe^{3+} até ao estado de completa redução em que três ferros se encontram no estado de oxidação +2 (Fe^{2+}) e um se encontra no estado de oxidação +3 (Fe^{3+}).

O sinal de EPR obtido a partir da *cubane-cluster* é bastante incomum e difícil de detectar a partir da proteína nativa. Este é um factor que teve influência na classificação inicial errónea da constituição dos clusters. Visto o seu sinal de EPR quando o *cluster* híbrido está ausente (através de mutação de um dos aminoácidos que formam o motivo de ligação destes núcleos metálicos à proteína) ser semelhante ao observado para o núcleo $[4Fe-4S]^{1+}$ encontrado em compostos sintéticos, este parece ser o primeiro exemplo biológico deste tipo de estrutura.

Com este avanço no conhecimento estrutural desta proteína invulgar, o seu nome inicial foi alterado, visto o *cluster* que lhe deu o nome ter sido erroneamente classificado, e esta passou a ser denominada Hybrid Cluster Protein (Hcp).

Desde a descoberta desta proteína em *D. vulgaris* e *D. gigas*, outros ortólogos do gene que codifica para uma Hcp foram identificados, apresentando valores de identidade altos e distribuídos numa grande quantidade de espécies bacterianas e de archeas, em que todos os resíduos que servem de ligandos para o *cluster* híbrido são altamente conservados.

Através da comparação das estruturas primárias das diferentes Hcp's conhecidas, foi possível distinguir três classes de Hcp's tendo por base o espaçamento dos clusters de cisteína nos motivos de ligação da proteína à *cubane-cluster*:

Quadro 3 – Classes de Hcp existentes. Esta classificação baseia-se na comparação do espaçamento dos clusters de cisteínas nos motivos de ligação da proteína à *cubane-cluster*. (adaptado de Cooper et al^[18])

Classe	Característica	Onde se encontra	Espaçamento
1	Espaçamento dos ligandos de cisteínas N-terminais para a <i>cubane-cluster</i>	Apenas em bactérias estritamente anaeróbias e no archeon metanogénico <i>Methanococcus jannaschii</i>	Cys-X2-Cys-X7-8-Cys-X5-Cys
2	Espaçamento dos ligandos de cisteínas N-terminais para a <i>cubane-cluster</i>	Bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas	Cys-X2-Cys-X11-Cys-X6-Cys
3	Espaçamento dos ligandos de cisteínas N-terminais para a <i>cubane-cluster</i> igual ao da classe 1. Tem contudo uma deleção no aminoácido 116 a jusante do cluster N-terminal de cisteínas.	Bactérias e archeas hipertermófilicas	Cys-X2-Cys-X7-8-Cys-X5-Cys

As Hcp's de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, segundo a classificação acima apresentada, pertence classe 1 de *Hybrid Cluster Proteins*^[4]
Estudos posteriores vieram confirmar as previsões estruturais que se tinham feito para esta proteína e pormenorizar a definição dessa mesma estrutura (Fig.6)^{[74][18][64][2]}.

Assim obtiveram-se caracterizações bastante completas destes *clusters*.

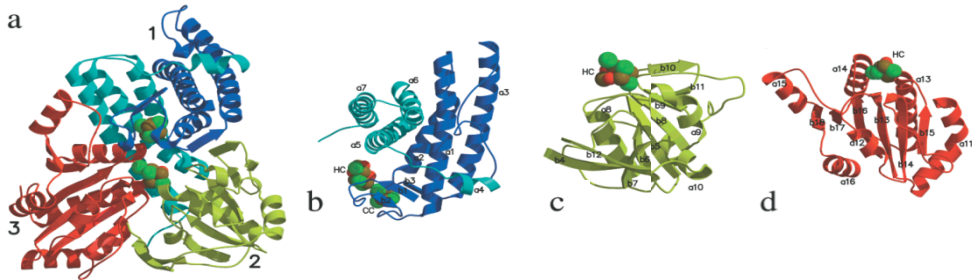


Figura 6 - *Fold* global da Hcp. (a) Representação esquemática da estrutura 3D. Domínio 1 mostrado a azul (claro e escuro), domínio 2 a verde e o domínio 3 a vermelho. (b) Domínio 1 isolado. (c) Domínio 2 isolado. (d) Domínio 3 isolado. (adaptado a partir de Cooper et al^[23])

4.2 – Função

Durante bastante tempo, e apesar da haver uma grande quantidade de dados espectroscópicos e estruturais, a função biológica desta proteína manteve-se pouco clara. Em 2002 Wolfe et al⁽²³⁾ sugere uma atividade de hidroxamina redutase. Este foi alertado para tal possibilidade pelas semelhanças estruturais e na sequência de aminoácidos do *cluster* híbrido e um *cluster* FeNiS do centro ativo de uma desidrogenase de monóxido de carbono (CODH) de *Rhodospirillum rubrum* e por descrições de que mediante certas alterações neste *cluster* era possível alterar a atividade da enzima para uma de hidroxilamina redutase. Estudos *in vitro* demonstraram atividade de hidroxilamina redutase sensível ao oxigénio sugerindo o seu papel na destoxificação de produtos secundários reativos da redução do nitrito. Esta atividade, contudo, é um pouco baixa, sendo necessária mais investigação.

Um dos organismos onde foi descoberta a expressão de uma Hcp foi o anaeróbio facultativo *E.coli* quando este era crescido anaerobicamente com nitrito ou nitrato^[107]

Visto na altura as espécies de *Desulfovibrio* (*vulgaris* e *desulfuricans*, de onde a proteína Hcp foi inicialmente purificada) não estarem facilmente acessíveis a estudos genéticos e fisiológicos, pois não só não existia ainda a sequenciação do seu genoma como o próprio manuseamento das estirpes não ser de tão grande facilidade, a descoberta desta proteína num modelo cujo genoma se encontrava já sequenciado e cujo o manuseamento era já dominado, trouxe grandes perspectivas.

Em 2006 haviam já descritas inúmeras Hcp em organismos tão distintos como enterobacteria, *clostridia*, bacteróides, cyanobacterias, *bacillus* sps., metanogénicas e protozoários (e.g. Entamoeba)^[1].

Dados obtidos em diferentes organismos pertencentes às diferentes classes referidas e a partir das suas Hcp's expressas em organismos modelo, sugeriram vários papéis para esta proteína incluindo o de proteção contra o stress oxidativo ^{[2][9]} o que levou Almeida et al^[1] a investigar a resposta desta proteína ao peróxido de hidrogénio, tendo sido descrita a indução da Hcp de *E.coli* pelo H₂O₂, o seu papel na proteção contra o stress oxidativo, a sua regulação pelo regulador de peróxido OxyR, bem como o sua função de peroxidase.

Em 2004, com a sequenciação do genoma de *D.vulgaris* Hildenborough ^[53] abriu-se o caminho para análises genómicas comparativas.

Existem então anotadas para *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough duas *Hybrid cluster proteins*: Hcp1 (DVU2013) e Hcp2 (DVU2543)^[93]. Estas apresentam um factor de identidade proteica de 47%. A primeira está localizada numa ilha genómicas da qual fazem parte mais 52 genes, entre eles a Roo1 (DVU2014). A segunda encontra-se noutro local do genoma. ^[57]

5 - HcpR (Hybrid Cluster Protein Regulator)

Em 2004, Rodionov et al ^[95] dedicaram-se à análise de várias δ -proteobactérias anaeróbicas redutoras de metais, entre as quais, *D. vulgaris* Hildenborough. Rodionov e a sua equipa foram identificar zonas palindrómicas a montante de genes envolvidos no metabolismo do enxofre em espécies de *Desulfovibrio* e descobriram um sinal palindrómico de sequência consenso TTGTGANNNNNTCACAA a montante dos operões *sat* e *apsAB*. Sendo este sinal semelhante à sequência consenso da CRP de *E.coli*, inferiram que um regulador do tipo CRP regularia os genes em questão.

Reguladores da família Crp/Fnr são reguladores transcricionais globais, amplamente distribuídos em bactérias. A sua estrutura característica é composta por um motivo *helix-turn-helix* (HTH) C-terminal que “encaixa” no sulco maior do DNA e um domínio de ligação a nucleótidos N-terminal. Esta classe de factores de transcrição são nomeados após a descoberta dos seus dois primeiros representantes em *E.coli*. Estes reguladores são depois agrupados em subfamílias (e.g. CoxA, Crp, Dnr, FixK, Fnr, HbaR, NnrR, etc.) segundo a sua afiliação filogenética. Membros desta família são tipicamente caracterizados por funcionarem como ativadores transcricionais, sendo associados à resposta a uma variedade de sinais intra e extracelulares como anóxia, monóxido de carbono, óxido nítrico e stress oxidativo e nitrosativo.

Em seguida, efetuaram um *scan* de todo o genoma de *D.vulgaris* em busca de sequências que coincidisse com o sinal palindrómico encontrado. Este sinal foi encontrado a montante de vários genes, entre eles do gene que codifica a Hcp

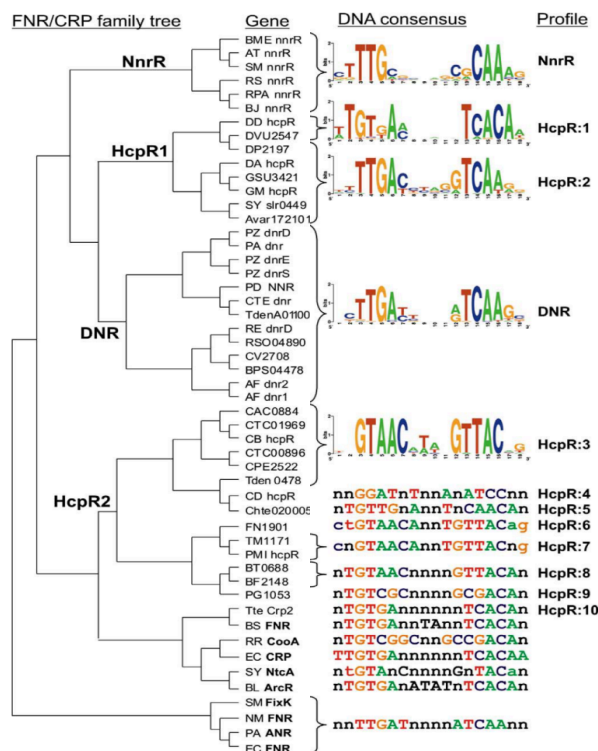


Figura 7 - Árvore filogenética de máxima verosimilhança da família FNR/CRP de reguladores transcricionais. (adaptado a partir de Rodionov et al ^[96])

e que afirmam ser co-expressada com uma ferredoxina hipotética, a que chamou FrdX. Adicionalmente, Rodionov verifica que os genes Hcp-frdX estão co-localizados com um gene de um regulador putativo da família de reguladores transcricionais CRP/FNR, a que deu o nome de HcpR (*Hybrid Cluster Protein Regulator*). ^[96]

Homólogos^[12] e Ortólogos^[18] próximos de HcpR foram detectados numa multitude de organismos, tanto em outras deltaproteobactérias (e.g. *Desulfotalea psychrophila*, *Desulfuromonas*) como em elementos de outros filos (Figura 7)

Embora o alvo principal dos reguladores HcpR sejam genes que codificam as Hcp e a hipotética FrdX, estes regulões estendem-se e incluem genes que codificam redutases de nitrato e nitrito NADH desidrogenases, entre outros.

Nas espécies de *Desulfovibrio* o regulão inclui os loci *apsBA* e *sat* (Fig. 8) envolvidos na via da redução do sulfato. Entre os genes hipotéticos, frequentemente contém genes do tipo ferredoxina, hemeritina ou citocromo c3, sugerindo também um papel na resposta a algum tipo de stress^[96].

Wall et al desenvolveu também interesse por este regulador putativo, tendo descrito a sua indução também pelo nitrito e nitrato. Em 2010, Chismon et al ^[16] demonstram que o operão *hcp-hcr* de *E.coli* é induzido na presença de nitrito, sendo a sua expressão dependente de ativação transcricional pelo FNR. Esta ativação por parte do FNR em *E.coli* foi ainda verificada em outros trabalhos^{[26][27]}.

Em 2011^[117], a sua equipa debruçou-se na caracterização funcional de 4 reguladores transcricionais globais da família dos Crp/Fnr, estando entre eles a HcpR. Assim, para além de uma análise filogenética deste regulador (até então putativo), foram também analisados os seus níveis de expressão bem como os níveis de expressão de todos os outros genes quando este está ausente. Esta caracterização foi feita sob várias condições de stress

Foi então observado o perfil de indução ou repressão génica quando o regulador em causa estava deletado. Genes que vissem o seu perfil alterado significativamente, estariam, de alguma forma, sob o controlo deste regulador.

Os dados obtidos apoiam então o papel de regulador proposto por Rodionov.

São descritos vários genes que estarão sob a regulação de HcpR, entre eles, como era já previsto, o gene *hcp2* (DVU2543), mas também o *ahpC* (DVU2247), que codifica uma catalase, o *fld* (DVU2680), que codifica uma flavodoxina reprimida pelo ferro e o *feoA* (DVU2574) que codifica um componente de um transportador de ferro ferroso.

Quadro 4 – Locais de *binding* putativos para um factor do tipo FNR/CPR HcpR

Gene	Operão	Local
208467		TTGTGAcATgTaTaACAA
206736	<i>sat</i>	TTGTaAAtTtTTTCACAA
206272	<i>apsAB</i>	TTGTtAAtTccaTCACAA
209106	<i>phcAB</i>	aTGTGAcgcATTTCgCAA
207772	<i>cooMKLXUHXF</i>	TTGgGAAtcgaTTCACAA
208738	208738-208737	cTGTGAAAcATgTCgCat
206515	206515-206516	gTGTGAcccgTCACAg
209119		TTGTtcAcaAaaTCACAA
208040	<i>Hcp-frdX-adhE-208043</i>	aTtTGAcgcAcgTCACAA

Capítulo II – Objetivos

As *hybrid cluster proteins* são proteínas caracterizadas por possuírem centros Fe-S, em especial um cluster cuja estrutura lhes é característica e que lhe deu, por isso, o nome – o *hybrid cluster*. Embora muitos estudos tenham já sido realizados afim de averiguar o papel destas proteínas, tendo sido descrito o seu papel de hidroxilamina redutase *in vitro*, nenhum esclarecimento definitivo foi ainda obtido, não sendo claro qual o seu papel *in vivo*.

Desulfovibrio vulgaris Hildenborough é uma SRB, e foi o organismo onde esta classe de proteínas foi identificada pela primeira vez. Também neste organismo anaeróbio, o papel destas proteínas é elusivo, sendo apenas claro que estas, bem como o regulador HcpR que se encontra descrito como regulando uma das Hcp de *D. v. H.*, são induzidos pelo stress com nitrito. Existem contudo indícios de que esta proteína poderá estar envolvida na resposta ao stress oxidativo e pelo óxido nítrico. Neste sentido fomos avaliar o papel dos genes que codificam as proteínas referidas numa gama de diferentes elementos stressantes: oxigénio, peróxido de Hidrogénio, óxido nítrico e nitrito.

Como referido, HcpR é descrito como sendo o regulador e pelo menos uma Hcp de *D. vulgaris* Hildenborough, contudo, nunca foi demonstrada a interação direta desta proteína com as zonas reguladoras dos genes que regula. Fomos então também avaliar a possível interação deste regulador com as zonas promotoras dos genes que codificam as Hcp.

Assim, afim de esclarecer os pontos referidos fomos:

1. Avaliar o comportamento dos mutantes $\Delta hcp1$ e $\Delta hcp2$ (bem como $\Delta hcpR$) quando expostos ao oxigénio atmosférico e ao peróxido de Hidrogénio. Esta avaliação foi feita tanto a nível de culturas líquidas como da realização de plaqueamentos;
2. Realizar ensaios de complementação numa estirpe sensível ao NO (estirpe de *E.coli* K-12 mutante para gene *norV*, o que lhe confere sensibilidade a este tipo de stress) com os genes *hcp1* e *hcp2*. Foram também realizados ensaios de complementação com outro gene, codificante para *roo1*, uma proteína flavodiiron cujos homólogos foram já envolvidos na defesa e destoxificação contra este tipo de stress, visto ser uma boa candidata à observação de complementação (foi tentada a clonagem também de *roo2*, sem sucesso). Este ensaio foi colmatado com ensaios de crescimento de mutantes para *roo1* e *roo2* sob stress de NO afim de avaliar as suas viabilidades.
3. Clonar o gene *HpcR*, expressá-lo e purificar o seu produtos.
4. Realizar ensaios de EMSA em que se usaram como sonda as zonas promotoras dos genes *hcp1* e *hcp2*. Fomos também avaliar a afinidade para outras zonas reguladoras referentes a outros genes (*fld*, *feoA*, *ahpC*) descritos como sendo regulados por esta proteína.
5. Avaliar qual o nível de expressão dos genes *hcp1* e *hcp2* (bem como *roo1* e *roo2*) no mutante para o regulador HcpR.

Capítulo III – Material e Métodos

1. Reagentes e Enzimas

1.1. Químicos

Todos os químicos e reagentes usados ao longo deste trabalho eram de gama analítica ou de máxima pureza.

Quadro 5 - Reagentes usados e seus fornecedores

Marca	Composto
Sigma Aldrich	n-Butanol; Clorofenicol; Cloreto de Cobalto; EDTA; G-418; L-Histidina; Igepal CA-630; Ácido Maleico; Molecular Ladder 100bp; Sulfato de Níquel; Hidrogenofosfato de potássio di-básico; <i>Standard</i> de Proteínas; Molecular Ladder 1Kb; Tioglicolato de Sódio; Spermina Nonoato; Glucose; Tetraciclina; L-Treonina; Tween 20; TEMED; HEPES; Fenol
WVR	Glicina
Cayman Chemicals	DPTA Nonoato
Promega	DTT; Molecular Ladder 1kB; Base Tris
Merck	Ácido Acético; Agar; Cloreto de amónia, L-Arginina, Ácido Ascórbico; Azul de Bromofemol; Cloreto de Cálcio; Comassie brilliant Blue R-250; Glucose; Glicerol; Sulfato de Amónia Ferroso; Cloreto de ferro; Sulfato de Magnésio; Cloreto de Manganês; Metanol; β -Mercaptoetanol; Molibdato de Sódio; Nitrito de Sódio; Selenite de Sódio; Sulfato de Sódio; Ácido Sulfúrico; Cloreto de Zinco; Cloreto de Cobre; Cloreto de Potássio.
Roth	Acrilamida; bis-acrilamida; Ampicilina; Imidazol; IPTG; Canamicina; SDS; X-Gal
Invitrogen	Agarose; Peróxido de Hidrogénio 30%; SyberGreen
Pronalab	Hidróxido de Potássio; Citrato de Sódio
Riedel	APS; Ácido Bórico; Di-Hidrogenofosfato de Sódio; Lactato de Sódio 50%;
Roche	CSDP ready to use

Fluka	L-Cisteína; Di-hidrogenofosfato de potássio; L-Prolina; DMSO
Difco	Bacto Agar; Meio LB; Extracto Levedura; TSA; Triptono;
Pierce	Reagente de Bradford A e B
Amersham	<i>Standard</i> de pesos moleculares de proteínas
Riedel de Haen	Cloreto de Magnésio
Panreac	Sulfato de Amónia, Etanol Absoluto; Cloreto de Sódio
Thermo Scientific	Reagente Pierce BCA para ensaios de proteína (A e B)

1.2. Enzimas modificadoras de DNA

A *Taq* DNA polimerase, a T4 DNA ligase bem como todas as enzimas de restrição usadas (*KpnI*, *PstI*, *SmaI*, *EcoRI*, *NdeI*) foram compradas à *New England Biolabs*. A *Phusion® High-Fidelity* DNA polimerase foi comprada à *Finnzymes - Thermo Fisher Cientific*.

A Lisozima foi obtida da Roth.

No quadro a baixo apresentam-se as sequências reconhecidas pelos enzimas de restrição usadas.

Quadro 6 – Enzimas de restrição usadas e respectivas sequências de reconhecimento, estando os tipos de corte realizados assinalados com setas

Enzima	Local de restrição
KpnI	GGTAC↓C C↑CATGG
PstI	CTGCA↓G G↑ACGTC
SmaI	CCC↓GGG GGG↑CCC
EcoRI	G↓AATTC CTTAA↑G
NdeI	CA↓TATG GTAT↑AC
Sall	G↓TCGAC CAGCT↑G

Enzimas como a Transferase Terminal, a Transcriptase reversa e DNaseI fazem parte integrante dos kits em que são usadas.

1.3. Anticorpos

Anti- Digoxigenina-AP

Policlonal de ovelha 750U/mL, Anti-Digoxigenina, fragmento Fab conjugado com fosfatase alcalina. Kit DIG Gel Shift, 2nd Generation.

2. Estirpes Bacterianas

Todas as estirpes de *E.coli* foram obtidas através da Promega ou Biocompare, à exceção da estirpe $\Delta norV$, cuja mutação foi efectuada pelo laboratório de acolhimento no contexto de trabalhos anteriores [5].

Todas as estirpes de *D.vulgaris* Hildenborough foram cedidas pelo laboratório da Prof. Judy Wall, Universidade do Missouri.

2.1. E.coli:

Quadro 7 - Estirpes celulares de *Escherichia coli* que foram usadas ao longo do trabalho desenvolvido bem como sua breve descrição

Estirpe	Descrição
XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i> Choque térmico – 45seg
JM109	F' (traD36, proAB ⁺ lacI ^q , lacZ Δ M15) <i>endA1 recA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) mcrA supE44 λ⁻ gyrA96 relA1 Δ(lacproAB)</i> Choque térmico – 45seg
BL21(DE3) Gold	F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ (DE3) endA Hte Choque térmico – 20seg
LMS2710	Mutante $\Delta norV$; <i>norV::Cm^r</i> Choque térmico – 90seg
JM109 (DE3)	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), relA1, supE44, λ⁻, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qΔM15], lDE3</i>
pLysS Star	F ⁻ ompT hsdSB (r _B -m _B ⁻) gal dcm rne131 (DE3) pLysS (Cam ^R) Choque térmico – 30seg

2.2. *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Quadro 8 – Estirpes bacterianas usados ao longo do trabalho desenvolvido bem como sua breve descrição

Estirpe	Descrição
<i>Wilde Type</i>	NCIMB 8303; ID Taxonómico: 882;
Estirpe $\Delta hcpR$; JW9011	$\Delta dvu2547$; Resistência à Neomicina. Seleção efectuada com o Geneticina (G418) numa concentração de 400µg/mL.
Estirpe $\Delta hcp1$; GZ6896	$\Delta dvu2013$; Resistência à Neomicina. Seleção efectuada com o Geneticina (G418) numa concentração de 400µg/mL.
Estirpe $\Delta hcp2$; GZ11714	$\Delta dvu2543$; Resistência à Neomicina. Seleção efectuada com Geneticina (G418) numa concentração de 400µg/mL.
Estirpe $\Delta roo1$; GZ14874	$\Delta dvu2014$; Resistência à Neomicina. Seleção efectuada com o Geneticina (G418) numa concentração de 400µg/mL.
Estirpe $\Delta roo2$; GZ2505	$\Delta dvu3185$; Resistência à Neomicina. Seleção efectuada com o Geneticina (G418) numa concentração de 400µg/mL.

3. Plasmídeos

Quadro 9 – Plasmídeos usados ao longo do trabalho desenvolvido bem como sua breve descrição.

Nome do plasmídeo	Descrição
pET28a+	Plasmídeo de 5369bp. Trata-se de um vector de expressão, usando o sistema de indução pelo IPTG. Possui uma His•Tag®/trombina/T7•Tag® N-terminal. Resistência Kan ^r ₃₀
pET28a+ <i>hcpR</i>	ORF de <i>hcpR</i> de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough com extremidade <i>NdeI</i> a montante (corte coincidente com codão de iniciação, alterando o aminoácido inicial de uma Valina para uma Metionina) e <i>EcoRI</i> a jusante clonada em pET28a+ digerido com as mesmas enzimas. Resistência Kan ^r ₃₀

pET24a+	Plasmídeo de 5310bp. Trata-se de um vector de expressão, usando o sistema de indução pelo IPTG. Possui uma T7•Tag ® N-terminal. Resistência Kan ^r ₃₀
pET24ahcpR	ORF de <i>hcpR</i> de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough com extremidade <i>NdeI</i> a montante (corte coincidente com codão de iniciação, alterando o aminoácido inicial de uma Valina para uma Metionina) e <i>EcoRI</i> a jusante clonada em pET24a+ digerido com as mesmas enzimas. Resistência Kan ^r ₃₀
pUC18	Este plasmídeo codifica o α-peptido da β-galactosidase que complementa a mutação pela deleção lac em estirpes de <i>E.coli</i> . Permite a seleção azul/branco desde que o meio seja suplementado com X-Gal e IPTG e sejam usadas na transformação células com a deleção <i>lac</i> . Resistência Amp ^r ₁₀₀
pUC18hcp1	ORF de <i>hcp1</i> de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough com extremidade <i>blunt</i> a montante e <i>PstI</i> a jusante clonada em pUC18 com extremidades compatíveis. Resistência Amp ^r ₁₀₀
pUC18hcp2	ORF de <i>hcp2</i> de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough com extremidade <i>blunt</i> a montante e <i>PstI</i> a jusante clonada em pUC18 com extremidades compatíveis. Resistência Amp ^r ₁₀₀
pUC18roo1	ORF de <i>roo1</i> de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough com extremidade <i>blunt</i> a montante e <i>PstI</i> a jusante clonada em pUC18 com extremidades compatíveis. Resistência Amp ^r ₁₀₀

4. Kits

Quadro 10 – Kits utilizados durante o trabalho laboratorial, com a respectiva marca e aplicação no trabalho.

Nome Kit	Marca	Aplicação
Purificação de PCR QIAquick	Qiagen	Limpeza de DNA linear
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen	Isolamento de plasmídeo
Wizard® Kit de Purificação de DNA Genómico	Promega	Isolamento de DNA genómico
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche	Síntese de cDNA por retrotranscrição
DIG Gel Shift, 2 nd Generation	Roche	EMSA
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Isolamento de RNA
Ambion® RNA Turno DNA-free	Invitrogen	Limpeza RNA/Digestão DNA

5. Equipamentos

As centrifugações de eppendorfs ou tubos semelhantes (colunas de kits) foram realizadas numa MiniSpin plus da Eppendorf. As centrifugações até 62.000 xg e de volumes superiores a 25 mL foram efectuadas em centrifugas refrigeradas Beckman Avanti J-25I e Beckman Avanti J-26 XP e todas as ultracentrifugações (centrifugações acima de 62.000 xg) foram efectuadas na Ultra centrifuga refrigerada Beckman Optima LE-80K.

A fixação do DNA a membranas de nylon positivamente carregadas após *blot* foi efectuada no UVStrataLinker 18000. A aquisição de imagens de quimioluminescência foi efectuada no aparelho Chemidoc™ XRS⁺ da Biorad.

Todas as determinações de OD₆₀₀ e leituras espectrofotométricas em cuvette foram efectuadas no espectrofotómetro UV-1700 Pharmaspec – Shimadzu.

Todos os manuseamentos em esterilidades, à excepção dos plaqueamentos, foram efectuados na câmara de fluxo laminar vertical Faster Bio48.

As reações de amplificação foram realizadas termociclador MyCycler Thermal Cycler da Biorad .Todas as quantificações de DNA e RNA foram efectuadas recorrendo ao aparelho Nanodrop 2000 da Biorad.

As lises celulares para purificação proteica foram realizadas recorrendo ao aparelho de disrupção celular French Press da Thermo Scientific. Purificações e concentrações proteicas, bem como os ensaios de *binding* foram efectuados na câmara anaeróbia de Vinil, Modelo B, da Coy, a fim de serem realizadas em condições de anóxia. Para a purificação da HcpR foi usada uma coluna manual Chelating Sepharose Fast Flow da GE Healthcare seguida do processo de concentração onde se recorreu a células de ultrafiltração com agitação da Amicon com membranas com um *cut-off* de 10kD (modelos de 50 e 10mL). A troca de tampão após o passo de concentração foi efectuada usando uma coluna de Desalting PD10 da GE Healthcare. Quando necessário concentrar proteína até volume inferiores a 3.5mL, recorreu-se a colunas de concentração comerciais Nanosep com membrana Omega com um *cut-off* de 10kD obtidas a partir da Sigma . A determinação da absorvências a 562nm para as quantificações proteicas em placa foram realizadas recorrendo ao espectrofotómetro de microplacas Multiskan Go da Thermo Scientific.

Todas as incubações de culturas a 37°C sem agitação foram efectuadas em estufas das Binder. Por sua vez, as incubações a 37°C e 20°C com agitação foram realizadas na orbital Minitron da Infors HT.

A fim de criar uma atmosfera anóxica, os crescimentos em placa de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough foram incubados no interior de caixas anaeróbias (herméticas) suplementadas com saquetas *GenBox anaer* (contendo carvão activado, ascorbato de sódio e outros componentes orgânicos e inorgânicos) que eficazmente captam o oxigénio atmosférico e libertam dióxido de carbono. Insere-se também um indicador de anaerobiose impregnado com azul de metileno e de um agente redutor, ficando o azul de metileno incolor na ausência de oxigénio e azul na sua presença . Todo o conjunto é da Biomérieux.

Electroforese em gel de agarose foram realizadas no sistema Mini-Sub Cell GT associado a uma fonte de alimentação Power Pack300, ambos da Biorad. Em concordância também o sistema de electroforeses em gel de SDS (composto por um sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell) e o sistema de electroforese de transferência de DNA de gel para membrana (Trans Blot SD Semi-Dry Cell) bem como a fonte de alimentação Power Pack3000 que ambos estão assoviados foram obtidos a partir da Biorad.

Todas as determinações do pH foram efectuadas no electrodo de pH da Crison associado ao medidor Basic 20 também ele da Crison.

6. Software

6.1. Pack DNASTar Lasergene

Software de análise de sequências de DNA que inclui software de alinhamento de sequências, de edição de sequências e de design de primers, entre outros.

Pack composto por :

Editseq

Editor de sequências;

PrimerSelect

Editor de Primers

Mapdraw

Construtor de mapas de restrição

Megalign

Alinhamento de Sequências de DNA e Proteicas

6.2. Aquisição e tratamento de Imagem de géis de Agarose

Software Kodac Digital Science. Permite não só a aquisição como o tratamento das imagens resultantes da detecção da emissão do corante utilizado para a marcação do *dsDNA* (SYBRgreen 1X)

6.3. Detecção de quimioluminescência

Software Image Lab. Permite não só a visualização do tipo ficheiro em que são obtidas as imagens como também a sua conversão para outros formatos e o seu tratamento.

6.4. Conversor de unidades

Software online que permite a conversão de massa em quantidade molar (concentração molar) e vice-versa.

Para ácidos nucleicos - http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_07.html

Para proteínas - http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_04.html

6.5. GraphPad Prism

Software que combina funções de bioestatística, fitting de curvas (regressões não lineares) e grafismo científico.

Este software foi usado no tratamento estatístico e na construção dos gráficos referentes aos crescimentos celulares.

7. Meios e soluções

Os meios e soluções foram preparados misturando os constituintes até à homogeneidade seguidos de esterilização por autoclavagem em frascos ou erlenmeyers rolhados, mas não selados, a uma temperatura de 121°C e uma pressão de 1.3 bar durante 20 min. A exceção são os frascos com meio LS4D anaeróbios para crescimentos de *D.vulgaris* Hildenborough. Todas os meios foram preparados em água bidestilada bem como a maioria da soluções usadas.

Os meios sólidos, após autoclavados foram vertidos em caixas de Petri para solidificar. Os meios de cultura foram arrefecidos até à temperatura ambiente antes de qualquer inoculação, plaqueamento ou repicagem. Filtração recorrendo a filtro de 0,22µm de poro foi efectuada sempre que necessário esterilizar qualquer solução contendo um ou mais componentes sensíveis à temperatura não podendo por isso ser submetidos a autoclavagem, sobre o risco de ocorrer a sua degradação.

7.1. Crescimento *E.coli*

Meio Luria-Bertani (LB)	LB Broth 25 g/L
Meio Luria-Agar (LA)	LB Broth 25 g/L, Agarose 15 g/L
SOB	Triptono 20 g/L, Extracto de Levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L
SOC^[15]	SOB 970µL/mL, Glucose 20µM, Solução Stock MgCl ₂ +MgSO ₄ 10µM
M9b 5X (sais)^{[21][36]}	K ₂ HPO ₄ .7H ₂ O 52.3 g/L, KH ₂ PO ₄ 22.5 g/L, (NH ₄) ₂ SO ₄ 5,02 g/L, Na ₃ .citrato.2H ₂ O 2,5 g/L
Meio Mínimo B^[58]	M9b 1X, MgSO ₄ 1mM, Timina 10µg/mL, Leucina 40µg/mL, Treonina 40µg/mL, Arginina 40µg/mL, Histidina 40µg/mL, Prolina 40µg/mL, MnCl ₂ 10 µM, Glucose 40µM.
Solução Stock de MgCl₂+MgSO₄	MgCl ₂ 1M, MgSO ₄ 1M

7.2. Crescimento *D. vulgaris* Hildenborough

Meio LS4D^{[80][7]}

MgCl₂ 8mM, NH₄Cl 20mM, CaCl₂ 0.6mM, K₂HPO₄ – NaH₂PO₄ 2mM, FeCl₂/EDTA 0,06mM/0,12mM, Tris-HCl pH 7.4 30mM, Extracto de Levedura 1g/L, Lactato de sódio 60mM, Sulfato de sódio 30mM e Trace Elements 0,5X. Frascos de 100 ou 50mL, selados com rolhas de borracha e cápsulas de metal, contendo respectivamente 50 ou 30mL de meio. Desarejados sob fluxo de azoto gasoso de 20-40min e autoclavados.

Trace Elements (83.3X)^[83]

MnCl₂.6H₂O 0,5g/L, CoCl₂.6H₂O 0,3g/L, ZnCl₂ 0,2g/L, Na₂MoO₄.2H₂O 0,05g/L, H₃BO₃ 0.02g/L, NiSO₄.6H₂O 0.1g/L, CuCl₂.2H₂O 0.002g/L, Na₂SeO₃.5H₂O 0.006g/L, Na₂WO₄.2H₂O 0.008g/mL. Componente de meio LS4D.

Meio TSAS

TSA 40g/L, Lactato de sódio 2.5g/L, MgSO₄.7H₂O 2g/L, (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ 0.5g/L pH 7.2-7.4. Autoclavar. Adicionar tioglicolato/ácido ascórbico 200mg/L.

Tampão PBS

Na₂HPO₄ 10mM; NaCl 150mM

Tampão SRB

Hepes 10mM pH 6.3; Sacarose 270mM; MgCl₂ 10mM, Glicerol 20%

Stocks de antibióticos:

Canamicina

100mg/mL em H₂O

Tetraciclina

5mg/mL em metanol

Cloranfenicol

35mg/mL em etanol

Ampicilina

100mg/mL em H₂O

Geneticina (G418)

200mg/mL em H₂O

7.3. SDS Page

Loading Buffer 2X

Tris pH 6.8 100mM, SDS 4%, Azul de Bromofenol 0,2%, Glicerol 20%, β -Mercaptoetanol 2%. Agitar por 1h (mínimo)

Running Buffer (5X)

Glicina 72g/L; Tris 15g/L; SDS 5g/L

Solução Corante

Comassie brilliant Blue R-250 1g/L, Metanol 416mL/L, Ácido Acético Glacial 116 mL/L. Agitar por 1h. Filtrar com papel Whattman nº1.

Solução Descorante

Metanol 300mL/L, Ácido Acético Glacial 100mL/L.

7.4. Purificação Proteica

Tampão de ressuspensão

Tris-HCl 50mM, pH 8

Binding Buffer

Tris-HCl 20mM pH 7.5 , NaCl 500mM, Imidazole 10mM

Wash I

Tris-HCl 20mM pH 7.5 , NaCl 500mM, Imidazole 50mM

Wash II

Tris-HCl 20mM pH 7.5 , NaCl 500mM, Imidazole 100mM

Wash III

Tris-HCl 20mM pH 7.5, NaCl 500mM, Imidazole 250mM

Elute

Tris-HCl 20mM pH 7.5, NaCl 500mM, Imidazole 500mM

Strip Buffer

Tris-HCl 20mM pH 7.5 , NaCl 500mM, EDTA 50mM

Tampão Proteico

Tris-HCl 50mM pH 7.5; NaCl 250mM

7.5. Isolamento de RNA

Solução de paragem	Fenol 5% pH 4.3 em Etanol 100%. Aquando da pipetagem do fenol é necessário ter especial atenção a fim de retirar apenas a fase inferior das duas fases formadas no frasco do reagente
Tampão TE	Tris-HCl 10mM pH8; EDTA 1mM pH 8

7.6. *Electrophoretic mobility shift assay*

Tampão de marcação 5X	Cacodilato de potássio, Tris-HCl 0,125mM, BSA 1,25mg/mL pH 6.6
DIG-ddUTP	Digoxigenina-11-ddUTP 1mM, em H ₂ O bidestilada
TBE 10X	Tris-HCl 890mM; Ácido Bórico 890mM; EDTA 20mM, pH 8
<i>Binding Buffer</i> Kit (5X)	Hepes 100mM pH 7.6, EDTA 5mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 50mM, DTT 5mM, Tween 20 1% (w/v), KCl 150mM
<i>Binding Buffer</i> 1 (5X) ^{[11][45][12]}	Tris-HCl 50mM pH 7.5; KCl 250mM; DTT 5mM, Glicerol 12.5% (v/v); MgCl ₂ 25mM; Igepal CA-630 0,25%
<i>Binding Buffer</i> 2 (5X) ^{[11][45][12]}	Tris-HCl 100mM pH 7.5; KCl 500mM; DTT 5mM, Glicerol 25% (v/v); MgCl ₂ 25mM; BSA 0,5mg/mL
<i>Binding Buffer</i> 3 (5X) ^{[87][37]}	Tris-HCl 100mM pH 7.6; NaCl 500mM; Glicerol 37.5% (v/v);
<i>Binding Buffer</i> 4 (5X) ^{[87][37]}	Tris-HCl 100mM pH 7.6; NaCl 500mM; DTT 2.5mM, Glicerol 37.5% (v/v); BSA 125µg/mL
<i>Loading Buffer</i>	Tampão TBE 0,25X, Glicerol 34%, Azul de bromofenol 0,2% (w/v)

Tampão TEN	Tris 10mM, EDTA 1mM, NaCl 0,1M, pH 8.0
Tampão de Limpeza	Ácido Maleico 0.1M, NaCl 0,15M, Tween 20 0,3% (v/v), pH 7.5
Tampão de Ácido Maleico	Ácido Maleico 0.1M, NaCl 0,15M, pH 7.5. Ajustar pH com NaOH sólido
Solução de Bloqueio 10X	Reagente de bloqueio (Kit DIG Gel Shift, 2 nd Generation - Roche) 10% (w/v) em Tampão de Ácido Maleico agitando constantemente em placa aquecida (65°C) ou aquecer no micro-ondas e autoclavar. Reservar alíquotas de -15 a -25°C
Solução de Bloqueio 1X	Diluir Solução de Bloqueio 10X em Tampão de Ácido Maleico. Preparar sempre fresca
Solução de Anticorpo Anti-DIG-ddUTP	Centrifugar Anti-DIG-AP (Kit DIG Gel Shift, 2 nd Generation -Roche) no frasco original 5min a 6.800 xg antes de cada uso. Fazer diluição 1:10.000 (75mU/mL) em solução de Bloqueio 1X.
Tampão de Detecção	Tris-HCl 0,1M; NaCl 0,1M, pH 9,5

7.7. Técnicas de Transformação

Tampão TB	10mM Hepes, 15mM CaCl ₂ , 250 mM KCl e 55mM MnCl ₂ pH 6.7. Adicionar MnCl ₂ após acertar o pH da restante mistura com KOH. Filtrar
------------------	---

7.8. Técnicas de Transformação

TAE 50X	Tris-Base 242g/L, Ácido acético glacial 57.1mL/L, EDTA 0.5M pH 8 100mL/L
Loading Buffer 6X	Azul de bromofenol 2.5g/L; Xileno cianolFF 2.5g/L; Ficoll (type400) em água 150g/L

8. Crescimentos Celulares

Os crescimentos celulares em meio líquido foram efectuados maioritariamente como meio de avaliar sensibilidades de determinadas estirpes celulares quando expostas a um certo tipo de stress. A exceção são os pré-inóculos que funcionam como ponto de partida para outras técnicas laboratoriais (seja isolamento de plasmídeo, elaboração de stocks, etc.).

Crescimentos em meio sólido foram maioritariamente efectuados como meio de seleção de transformantes e de determinação de viabilidade (CFU's).

Durante todo o processo de manuseamento de stocks, estes foram mantidos constantemente em gelo.

Todas as centrifugações realizadas para culturas celulares foram efectuadas a 4°C.

8.1. Pré-inóculos de *E.coli*

Recorreu-se à elaboração de um pré-inóculo sempre que necessário ter uma cultura de *E.coli* de OD elevada (mas não de grande volume) para aplicações posteriores.

Todos os pré-inóculos foram efectuados em erlenmeyers de 100mL contendo 20mL de LB suplementado com o antibiótico adequado à seleção desejada. Dependendo do estado da fonte do inóculo (colónias de um plaqueamento ou um stock líquido), o pré inóculo foi realizado picando colónias com um palito estéril que foi depois inserido no meio ou inoculando 10-30µL do stock líquido. Esta cultura foi então crescida a 37°C, 150 rpm, *overnight*.

8.2. Stocks

Stocks líquidos foram efectuados sempre que necessário reservar células viáveis para aplicações futuras. Todos os stocks foram usados para a inoculação de pré-inóculos.

8.2.1. *E.coli*

Stocks de *E.coli* foram realizados retirando 750µL de pré-inóculo crescido *o/n*, adicionando 250µL de Glicerol 85% e homogeneizando por inversão. Estes foram depois reservados a -20°C ou -80°C.

8.2.2. *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Sempre que necessário elaborar stocks de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, efetuou-se um crescimento num frasco de 100mL com 50mL de meio LS4D que foi deixado a incubar a 37°C por um período de 2 a 3 dias. Em seguida centrifugou-se esta cultura 15min a 10.000 xg, ressuspensando o *pellet* celular em 1mL de Tampão SRB. Foram realizadas alíquotas de 500µL e reservadas a -20°C ou -80°C.

8.3. *E.coli* K-12 LMS2710 – Experiências de complementação

Qualquer ensaio de complementação baseia-se numa ideia central: a abolição de um fenótipo mutante pela inserção de uma sequência de DNA heterólogo (geralmente uma ORF específica) na célula.

Crescimentos para ensaios de complementação são efectuados com estirpes mutadas num gene específico, o que lhes confere um determinado fenótipo (geralmente este mutante é transformado com o plasmídeo em que se vai realizar a clonagem, mas sem qualquer inserção e que serve de controlo). A par com o crescimento destes mutantes, avalia-se também o crescimento da estirpe mutada transformada com um vector recombinante em que se inseriu um gene que se pensa que possa reverter fenótipo que caracteriza o mutante. Estes crescimentos são geralmente efectuados sob condições em que o mutante seja especialmente suscetível. Sendo tanto o mutante como o mutante transformado com o vector clonado submetidos às mesmas condições, pretende-se avaliar se a viabilidade será superior na estirpe complementada que na estirpe mutada sem esta complementação. Aqui pretendeu-se avaliar a possível complementação de uma estirpe mutada no gene *norV*, e portanto sensível ao stress nitroso, com 3 genes de interesse: *hcp1* (Dvu2013), *hcp2* (Dvu2543) e *roo1* (Dvu2014).

A fim de proceder aos ensaios de complementação foi necessário, em primeiro lugar, clonar os genes, atrás referidos, num vector. O vector selecionado foi o pUC18^[59]. Este plasmídeo foi isolado (secção III-9.5), digerido com SmaI/PstI (secção III-9.2) e ligado aos genes de interesse (secção III-9.3). Ao contrário do plasmídeo, os genes de interesse apenas sofreram digestão com PstI, não necessário uma digestão com SmaI pois a polimerase utilizada na amplificação destes genes origina já extremidades *blunt*. Os clones positivos que foram sequenciados e a sequência foi comprovada ser a correta (por alinhamento desta sequência com a sequência prevista para o gene) foram então usados para transformar a estirpe mutante para os ensaios de complementação.

Para proceder ao ensaio de complementação em si foi necessário, antes de mais, induzir competências nas células *E.coli* K-12 LMS2710 (células $\Delta norV$, sensíveis ao stress nitrosativo) através do método do cloreto de cálcio (secção III-9.10.2). Em seguida, a cada alíquota de células competentes, adicionou-se aproximadamente 100ng de DNA correspondente a cada um dos plasmídeos clonados com um gene que se pretendia saber se complementava a mutação da estirpe (pUC18*hcp1*, pUC18*hcp2*, pUC18*roo1*, bem como pUC18 vazio a fim de servir de controlo negativo). Incubou-se 30min em gelo (quanto maior o tempo de incubação maior irá ser a eficiência de transformação). Em seguida, procedeu-se à transformação destas células seguindo o protocolo do choque térmico (secção III-9.9), em cujo pulso de calor (42°C) foi de 90seg. Estes transformantes foram plaqueados (secção III-8.5.1) sem a adição do X-Gal e IPTG e usando como antibiótico de seleção Cloranfenicol 25µg/mL (referentes às células LMS2710) e Ampicilina 100µg/mL (referente à seleção do plasmídeo). Para cada uma das réplicas um conjunto de colónias aleatórias foram picadas e inoculadas num pré-inóculo. A partir deste pré-inóculo, foram inoculados frascos anaeróbios a fim de ficarem aproximadamente a OD₆₀₀=0,2. Isto foi conseguido determinando a densidade óptica do pré-inóculo e calculando qual o volume necessário inocular para a nossa cultura ficar à OD desejada. Cada frasco (50mL) continha 30 mL de Meio Mínimo B suplementado com ampicilina, selado e desarejado sob fluxo de

azoto gasoso. Estes frascos foram então colocados a crescer a 37°C, 150 rpm. Quando atingiram OD₆₀₀=0,3 foi-lhes induzido stress nitroso pela adição de Spermina Nonoato numa concentração final de 100µM. O crescimento foi seguido por 4-6h. Todas as amostras de cultura para leitura de OD's são obtidas recorrendo ao uso de seringas e agulhas

A concentração da solução de SperminaNONOATO (em NaOH 0,01M) foi determinada através da leitura da sua absorvência a 252nm e aplicando a lei de Lambert-Beer. O coeficiente de extinção molar usado foi 8.5 mM⁻¹ cm⁻¹. Este dador liberta NO numa estequiometria de 2mol por cada mol de Spermina Nonoato, tendo um tempo de meia vida, a 37°C, de 230 minutes.

8.4. *D. vulgaris* Hildenborough

Crescimentos líquidos são geralmente efectuados a fim de determinar o real efeito de um determinado parâmetro isolado que se pense influenciar o crescimento/viabilidade celular, quer de estirpes selvagens quer de estirpes mutantes.

Todos os crescimentos realizados foram efectuados partindo de um pré-inóculo inoculado a partir de stock celulares (de cada uma das estirpes de interesse) previamente elaborados e reservados a -20 ou -80°C.

Aqui, recorreu-se a crescimentos celulares de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough a fim de averiguar a relevância de determinados genes na resposta a certos tipos de stress. Isto foi avaliado pela comparação da viabilidade de células, tanto WT como mutantes, crescidas em condições ideais (Controlo) e na presença de um determinado elemento stressante (Teste).

Todos os crescimentos de *D.vulgaris* Hildenborough foram efectuados em meio LS4D. O primeiro passo num crescimento deste tipo foi a realização de um pré-inóculo em que se procede à inoculação de um stock da estirpe a usar (totalidade do stock) num frasco anaeróbio contendo o meio indicado. Este frasco foi previamente desarejado (sob fluxo de azoto) e selado com rolha de borracha e cápsula de metal. Aquando da inoculação, cada frasco foi suplementado com Genaticina 400µg/mL (resistência de todos os mutantes de *Desulfovibrio* usados), excetuando o frasco inoculado com a estirpe WT. O pré-inóculo foi deixado crescer a 37°C por um período mínimo de 2 dias. Para realizar os ensaios de crescimento, dependendo do número de réplicas a efetuar, um determinado número de frascos anaeróbios de 100mL contendo 50 mL de meio LS4D são inoculados a aproximadamente 1:20 (5%) a partir deste pré-inóculo e deixados a crescer de 1 a 2 dias. Procedeu-se então à recolha das células, centrifugando a cultura a 10.000 xg por 10 minutos. O *pellet* resultante foi ressuspensado em 1mL de meio. Determinou-se a OD₆₀₀ destas ressuspensões e calculou-se o volume necessário inocular para se obter a densidade óptica desejada (normalmente aproximadamente 0.1 unidades ópticas abaixo da qual se pretende induzir o stress). Os inóculos foram colocados a 37°C e deixados a crescer até atingirem a OD₆₀₀ desejada. Todas as amostras de cultura para leitura de OD's foram obtidas recorrendo ao uso de seringas e agulhas estéreis. Este tipo de crescimentos foram seguidos, na maioria dos ensaios, entre 6 a 8h.

Em todos os ensaios foram efectuadas sempre dois grupos contendo múltiplas réplicas para cada uma das estirpes usadas: o grupo Controlo em que as células estavam sob condições, tanto quanto possível, óptimas de crescimento e o grupo Teste em que as células estavam sob as mesmas condições que o grupo Controlo com a exceção da adição de um elemento indutor de stress cuja influência na viabilidade queremos avaliar.

Descontaminação destas culturas é efectuada pela adição de aproximadamente 800µL de NaOH 50% por 50mL de cultura. Isto vai causar uma alteração no pH e potencial redox do meio, o que resulta na morte celular observando-se a olho nú a sua precipitação óbvia.

8.4.1. Stress de Oxigénio

As culturas para a realização deste tipo de stress são obtidas como atrás referidas.

A fim de determinar o efeito do oxigénio na viabilidade do Wt e de cada um dos mutantes, foram aplicadas três estratégias distintas:

Estratégia 1 – Os crescimentos foram realizados em frascos anaeróbios de 50 ou 100mL com 30 ou 50mL de meio, respectivamente, até a OD onde se pretendia adicionar o stress ($OD_{600}=0.3$). Nesse momento os frascos foram abertos e apenas tapados com gaze e algodão devidamente esterilizados. Foram então colocados de novo a 37°C, sob agitação (150 rpm). Foram lidas OD's 1h, 2h e 3h após a indução do stress. Os controlos foram mantidos selados.

Estratégia 2 – Os crescimentos foram realizados em frascos anaeróbios de 50 ou 100mL com 30 ou 50mL de meio, respectivamente, até a OD onde se pretendia adicionar o stress ($OD_{600}=0.7$ ou 0.8). Nesse momento os frascos foram abertos e apenas tapados com gaze e algodão devidamente esterilizados. Foram então colocados de novo a 37°C. Foram lidas OD's 1h, 2h e 3h após a indução do stress. Os controlos foram mantidos selados.

Estratégia 3 - Acertou-se a OD inicial das culturas para 0.5 unidades ópticas. Quando a cultura atingiu uma $OD_{600}=1$, retiraram-se 500µL de cultura que foram inoculados em 2mL de meio LS4D não desarejado num erlenmeyer que se rolhou com algodão e gaze estéril. Este foi colocado a sob agitação (60 rpm) a RT por 15min. Após este período, realizaram-se CFU's (secção III-8.5.2.1). Para o controlo, o processo foi semelhante, mas sendo este plaqueado sem sofrer incubação e agitação.

8.4.2. Stress de Peróxido de Hidrogénio

As culturas para a realização deste tipo de stress são obtidas como atrás referidas.

A solução de H_2O_2 foi efectuada fazendo diluições sucessivas em água MQ a partir da solução de peróxido de hidrogénio comercial 30%. Esta diluição é toda feita em gelo.

Para este tipo de stress foram testadas diferentes concentrações de agente oxidante bem como diferentes técnicas para a determinação do seu efeito. As concentrações testadas foram 1mM, 750 μ M, 500 μ M e 150 μ M.

As técnicas usadas foram plaqueamento 1h após stress e 2h após stress (secção III-8.5.2.1) bem como plaqueamento (secção III-8.5.2.2) 6h após a indução do stress. Fizeram-se também crescimentos líquidos cuja OD₆₀₀ foi seguida 6 a 8h.

Para este tipo de ensaio, acertou-se a OD₆₀₀ inicial para 0.2 unidades ópticas. Quando a cultura atingiu uma OD₆₀₀=0,3, induziu-se o stress injetando o volume necessário de solução de peróxido de hidrogénio para se atingir a concentração desejada. A cultura foi então introduzida a 37°C. Foram lidas OD's de 30 em 30 min ou de 1 em 1h. Quando plaqueamentos foram necessários, a amostra foi retirada recorrendo também a seringa e agulha estéril.

8.4.3. Stress de Nítrito

As culturas para a realização deste tipo de stress são obtidas como atrás referidas.

A fim de induzir o tipo de stress indicado, a cultura foi suplementada com Nítrito de Sódio. Visto, após dissociação, a razão estequiométrica de Na e NO₂- ser de 1 para 1, assume-se que a molaridade de NaNO₂ adicionada é igual à concentração de NO₂- após dissociação. Assim, o stress foi induzido adicionando NaNO₂ 1M a fim de se atingir a concentração final desejada. As concentrações testadas foram 1mM e 2,5mM^[24]. O stress foi induzido quando a cultura atingiu a OD₆₀₀=0,3, sendo a OD seguida por 6-8h.

8.4.4. Stress de Óxido Nítrico

As culturas para a realização deste tipo de stress são obtidas como atrás referidas. Para este tipo de crescimento não foi usado diretamente o NO gasoso, mas sim um dador de NO, o DPTA Nonoato, também denominado Dipropilenetriamina NONOato. Este composto foi dissolvido em NaOH 0,01M de forma a criar uma solução com uma concentração de 100 mM que foi depois alíquotada e reservada a -80°C. Quando a cultura atingiu um OD₆₀₀=0,3 foi adicionado o volume necessário de solução de DPTANONOato para se atingir uma concentração final de 100 μ M de DPTA. Este dador liberta NO numa estequiometria de 2mol por cada mol de DPTA Nonoato tendo um tempo de meia vida de 180 minutos a 37°C. As culturas foram seguidas 6-8h.

8.5. Plaqueamentos

Plaqueamentos em meio sólido foram realizados sempre que necessário proceder a uma seleção celular de forma a isolar transformantes ou como meio de avaliar a densidade e viabilidade celular de uma cultura(CFU).

Os plaqueamentos foram efectuados à chama. Todas as placas foram feitas no próprio dia de uso ou 1-4 dias antes e reservadas a 4°C (preferencialmente feitas de fresco).

8.5.1. *E.coli*

Estes plaqueamentos foram efectuados em placas de Petri de 90mm contendo aproximadamente 20mL de meio LA suplementado com o antibiótico referente à resistência do plasmídeo que queremos seleccionar.

Em crescimentos onde se estava a tirar partido da seleção azul/branco, nomeadamente em células transformadas com pUC18, o meio foi também suplementado com IPTG 1mM e X-Gal 50µg/mL. As placas foram mantidas no escuro, devido à degradação do X-Gal pela luz .

Sempre que foram necessárias repicagens, estas foram efectuadas picando cada colónia com uma palito estéril e plaqueando pelo métodos do riscado. A placa estaria já dividida por esquadria numerada e o plaqueamento de cada colónia era efectuada numa célula isolada dessa grelha. Esta técnica foi aplicada essencialmente para marcar os clones a que se efectuou PCR de colónias e em situações onde se aplica a seleção azul/branco de forma a obter uma maior massa celular e portanto melhor discernir a verdadeira cor de determinadas colónias.

As placas foram deixadas a crescer a 37°C o/n. Sempre que necessário reservar placas, estas foram colocadas a 4°C. Plaqueamentos de células para expressão foram descartados após um período máximo de 2-3 semanas.

8.5.2. *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Todos os crescimentos foram efectuados em placas de petri de 50mm X 12 mm e 90 mm X 15 mm contendo 7 e 20mL de meio TSAS, respectivamente. Todos os plaqueamentos foram crescidos a 37°C dentro de caixas herméticas contendo no interior 1 a 3 saquetas redutoras atmosféricas (dependendo do volume da caixa), bem como um indicador de anóxia. Cada plaqueamento foi deixado a crescer por um período mínimo de 2 dias, sendo a incubação terminada antes de os subprodutos negros do metabolismo de *D.v.H* se acumularem e impedirem a contagem de colónias.

Diluições para plaqueamento foram efectuadas em PBS.

8.5.2.1. CFU's

Recorreu-se a plaqueamentos para contagem de Colony-Forming Units (CFU) como complemento às leituras de OD espectofotométricas, que nos falam de facto sobre a densidade óptica, ou seja, do número de células em suspensão mas não sobre a viabilidade dessas mesmas células.

Para efetuar CFU's, foram efetuadas diluições sucessivas da cultura em tampão PBS na ordem dos 10^{-1} . De cada diluição de interesse, determinada por um teste de plaqueamento prévio, foi plaqueado um volume de 7 μ L. Este inóculo foi então espalhado por toda a superfície da placa com o auxílio de uma ansa estéril da forma mais homogênea possível. As placas foram então colocadas em caixas herméticas (contendo saquetas indutoras de anóxia) deixadas a crescer a 37°C como referido acima.

8.5.2.2. Spot

Recorreu-se ao plaqueamento em Spot como forma alternativa de avaliar a densidade e viabilidade celular de modo claro e simples, visto ser possível, através deste método o plaqueamento, na mesma placa, de diluições sequenciais bem como de conjunto teste e controlo. Isto leva a uma melhor e mais fácil análise visual dos resultados.

Assim, para este tipo de plaqueamento, cada placa foi dividida numa esquadria imaginária, sendo colocadas sequencialmente, da esquerda para a direita, as várias diluições (cerca de 5) de uma determinada réplica controlo, e na linha da esquadria a baixo desta as diluições correspondentes da réplica teste respectiva. De cada diluição de interesse foram plaqueados 5 a 7 μ L, sendo a amostra aplicada, sem espalhar numa célula circunscrita da grelha imaginária. As placas foram então colocadas em caixas herméticas e deixadas a crescer a 37°C como referido acima.

9. Técnicas de Biologia Molecular

9.1. PCR

Recorreu à técnica de PCR ou Polimerase Chain Reaction a fim de proceder à amplificação exponencial de sequências de DNA.

Esta técnica tem por base o uso de uma DNA polimerase que irá ler e criar cópias de qualquer sequência de DNA. Contudo, para que esta reação ocorra e seja direcionada, é necessário adicionar à reação oligonucleótidos que possuem complementaridade com as extremidades da zona que queremos amplificar, denominados *primers*, que vão funcionar como iniciadores da reação catalisada pela polimerase, e os nucleótidos que vão funcionar como os blocos de construção.

Assim, em qualquer amplificação existem 3 passos essenciais: a desnaturação, a hibridação e a extensão. A desnaturação garante que o DNA a amplificar está sob a forma de cadeia simples, estando assim acessível aos *primers* e à DNA polimerase. Isto permite levar a cabo o hibridação, que consiste no emparelhamento dos *primers* com o DNA, sendo para isso necessário que a temperatura usada neste passo seja abaixo da temperatura de *melting* do par de primers usado, mas não tão baixo que o emparelhamento se torne inespecífico. O passo seguinte é a extensão, que consiste na atividade da polimerase em si, isto é, na leitura do DNA e polimerização da sequência complementar. Neste passo temos então de ter em conta a temperatura óptima para a atividade desta enzima, o tamanho da sequência a amplificar bem como a taxa de polimerização da enzima usada.

Todas as reações foram preparadas em gelo.

9.1.1. Desenho de *primers*

Todos os primers foram desenhados recorrendo ao software Lasergene EditSeq, garantindo sempre que o seu tamanho variasse entre 18 e 25 bp, que os nucleótidos localizados na extremidade do segmento de DNA fossem G ou C e que a diferença na temperatura de melting entre o *primer Forward e Reverse* fosse no máximo de 1°C. *Primers* desenhados com o intuito de amplificar regiões para clonagem tiveram inseridos na sua sequência regiões de corte reconhecidas por enzimas de restrição por nós determinadas (de acordo com o MCS do vector e desejada do insert).

Na tabela em baixo apresentam-se os primers usados. Os locais de corte inseridos aquando do desenho dos mesmos encontram-se destacados.

Quadro 11 – Sequências dos *primers* utilizados ao longo do trabalho, bem como o nome e tamanho das zonas amplificadas. Para cada zona apresenta-se o *primer forward* e *reverse*, por esta ordem, bem como, caso exista, o local de corte introduzido (sequência reconhecida a **bold** e sublinhada)

Zona amplificada	Primers (Frw e Rev)	Local restrição	Amplificado
Zona promotora <i>hcp1</i> (<i>Dvu2013</i>)	5'GGTTCATACGGCTGGGGCG 3' 5'CGTGCATCCCGTATTCTTCGC 3'	- -	305bp
Zona promotora <i>hcp2</i> (<i>Dvu2543</i>)	5'GCACAGGAGACATGAAAGGGG 3' 5'GCCGGTGAAAAAGCTGATGAT 3'	- -	221bp
Zona promotora <i>hcp2</i> (longa) (<i>Dvu2543</i>)	5'GCACAGGAGACATGAAAGGGG 3' 5'CTGTGCCACCAGCCGTCG 3'	- -	624bp
Zona promotora <i>fld</i> (<i>Dvu2680</i>)	5'CGGTGTTGCTTGTCTTACG 3' 5'GATGGTTTCGGCGGTGTATT 3'	- -	433bp
Zona promotora <i>feoA</i> (<i>Dvu2574</i>)	5'GGATGAGGGCCGATGTGAGG 3' 5'CACGGAGAGAACAGCAACGCAT 3'	- -	304bp
Zona promotora <i>ahpC</i> (<i>Dvu2247</i>)	5'GATCAAACGCGCGAAATACG 3' 5'CATTGCCGAGGACAGCTGAAAAG 3'	- -	402bp
Zona promotora <i>ftn</i> (<i>Dvu1568</i>)	5'GAGGCCCTGGTACCTGTCGC 3' 5'CGCTGGCTGTCGACGTCGGTC 3'	- -	396bp
<i>hcpR</i> (<i>Dvu2547</i>)	5'GAGTTCTAGCATATGCAGCGTATC 3' 5'CTCCACCAGAATTCCACTTGCG 3'	NdeI EcoRI	797bp

<i>hcp1</i> (Dvu2013)	5'GGTTCATACGGCTGGGGCG 3' 5'GGAGCTGCAGCCCCCCTTCATC 3'	- PstI	1941bp
<i>hcp2</i> (Dvu2543)	5'GCACAGGAGACATGAAAGGGG 3' 5'GTCCTGCAGTCGTCGGGTCG 3'	- PstI	1908bp
<i>roo1</i> (Dvu2014)	5'GGTTCCTTAAAAAATGGCAGGG 3' 5'CTGCTGCAGATCGCGTGACAATG 3'	- PstI	1562bp
<i>hcp1</i> (Dvu2013) interno	5' GAACCCCGGCATCCTCATC 3' 5' GGATGGGGCCGTTGAAGG 3'	- -	215bp
<i>hcp2</i> (Dvu2543) interno	5' GGCCTTCAGGACCTCACCATC 3' 5'CTGTGCCACCAGCCCGTCG 3'	- -	280bp

9.1.2. Amplificação a partir de DNA genómico

Todas as amplificações a partir do genómico foram efectuadas em reações de 50µL.

Todos os produtos foram limpos recorrendo ao kit PCR Purification (Qiagen). As enzimas de amplificação usadas foram a *Taq* DNA polimerase e a Phusion®.

Em amplificações usando estas enzimas, a composição da reação foi a seguinte:

Quadro 12 – Composição das reações de PCR usando DNA genómico e as enzimas *Taq* DNA Polimerase e Phusion.

Componente	Concentração final	
DNA genómico	50ng	50ng
dNTPs 10 mM	200 µM cada	200 µM cada
Primer Forward 10 µM	0,2 µM	0,2 µM
Primer Reverse 10 µM	0,2 µM	0,2 µM
Tampão respectivo	1X	1X
Enzima	0.025U/µL	0,02U/µL
	<i>Taq</i> DNA Polimerase	Phusion®

Sendo enzimas diferentes, também o programa de amplificação usado foi diferente; assim os programas de termociclagem geral aplicados foram:

Taq DNA polimerase			Phusion®:		
30seg	95°C	1 ciclo	30seg	98°C	1 ciclo
30 seg	95°C	30 ciclos	10 seg	98°C	35 ciclos
30 seg	45-68°C		30 seg	X°C	
1min por Kb	68°C		30seg por Kb	72°C	
5 min	68°C	1 ciclo	10 min	72°C	1 ciclo

Dependendo da temperatura óptima de *annealing* do par de *primers* a usar, a temperatura de hibridação foi determinada e testada. Dependendo do tamanho da zona a amplificar e da taxa de polimerização da enzima, os tempos de extensão foram ajustados.

Quadro 13 – Lista de DNA polimerases usadas. Descreve-se também a zona genómica amplificada.

Enzima usada	Zona amplificada
Taq DNA polimerase	Zona promotora <i>hcp1</i> (Dvu2013), Zona promotora <i>hcp2</i> (Dvu2543), Zona promotora <i>hcp2</i> (longa) (Dvu2543), Zona promotora <i>fld</i> (Dvu2680), Zona promotora <i>feoA</i> (Dvu2574), Zona promotora <i>ahpC</i> (Dvu2247), Zona promotora <i>ftn</i> (Dvu1568), <i>hcp1</i> (Dvu2013) interno, <i>hcp2</i> (Dvu2543) interno, <i>roo1</i> (Dvu2014) interno, <i>roo2</i> (Dvu3185) interno
Phusion®	<i>hcpR</i> (Dvu2547), <i>hcp1</i> (Dvu2013), <i>hcp2</i> (Dvu2543), <i>roo1</i> (Dvu2014)

9.1.3. Amplificação de confirmação de ausência de DNA no RNA isolado

Este tipo de PCR realiza-se a fim de verificar a pureza de RNA isolado, isto é, se de facto a amostra contém apenas RNA e não também DNA que tenha sido co-isolado. Para verificar esta pureza, faz-se uma reacção de PCR em que o RNA isolado é usado como molde e se usam os *primers* para qualquer gene codificado no genoma do organismo a partir do qual o RNA foi isolado. Visto os primer usados terem complementaridade com o DNA e não RNA do organismo, estando o RNA limpo de DNA não haverá qualquer produto de amplificação. Como controlo positivo faz-se uma reacção usando como molde DNA genómico. Neste trabalho, para verificar a limpeza do RNA extraído do mutante $\Delta hcpR$ de *D. vulgaris* Hildenborough fez-se uma reacção de PCR usando a nossa amostra de RNA como molde, Taq DNA Polimerase e os *primers* usados para amplificar o gene *hcp1* (Dvu2013) referidos atrás (secção III- 9.1.1).

Neste tipo de amplificações, a composição da reação foi a seguinte:

Quadro 14 – Composição da reação de PCR para confirmação de limpeza de RNA usando a Taq DNA polimerase

Componente	Concentração final
RNA	400ng
dNTPs 10 mM	200 µM cada
Tampão ThermoPol 10X	1X
Primer Forward 10 µM	0,2 µM
Primer Reverse 10 µM	0,2 µM
Taq DNA Polimerase	0.025U/µL

O programa de termociclagem geral foi o mesmo que aplicado para amplificações com a mesma enzima a partir do genómico.

9.1.4. Amplificação a partir de cDNA

Este tipo de PCR é usado como forma de avaliar os níveis relativos de mRNA (e assim o nível de expressão) referentes a diferentes genes. A ideia central desta técnica é que realizando múltiplas reações de amplificação em que se usa como molde o cDNA (sempre na mesma quantidade) obtido por retrotranscrição do RNA mensageiro isolado e primers internos para diferentes genes cuja expressão queiramos comparar, o nível de amplificação que se obtiver reflete o nível relativo de expressão desses mesmos genes no momento do isolamento. Como controlo positivo realiza-se também uma reação em que se usam os *primers* referentes ao retrotranscrito do 16sRNA, que é um dos RNAs mais abundantes na célula. Com esta técnica pode mesmo comparar-se a expressão relativa do mesmo gene em diferentes mutantes e Wt.

Neste tipo de amplificações, a composição da reação foi a seguinte:

Quadro 15 – Composição da reação de PCR a partir de cDNA usando a Taq DNA

Componente	Concentração final
cDNA	20ng
dNTPs 10 mM	400 µM cada
Tampão ThermoPol 10X	1X
Primer Forward 10 µM	0,6 µM
Primer Reverse 10 µM	0,6 µM
Taq DNA Polimerase	0.025U/µL

Os genes testados neste PCR, e assim, os genes que foram alvo de avaliação de expressão relativa foram: gene *hcp1* (*Dvu2013*), *hcp2* (*Dvu2543*), *roo1* (*DVU2014*) e *roo2* (*Dvu3185*). Os cDNA usados na reação foram os obtidos por retrotranscrição do RNA isolado do Wt e do mutante $\Delta hcpR$ de *D. vulgaris* Hildenborough. Como controlo positivo, para cada cDNA foi efectuada uma reação de amplificação usando os *primers* referentes à molécula retrotranscrita a partir do 16sRNA. Todos os *primers* encontram-se referidos atrás (secção III-9.1.1).

O programa de termociclagem geral foi o mesmo que aplicado para amplificações do genómico usando a mesma enzima.

9.1.5. PCR de colónias

O PCR de colónias é uma técnica de biologia usada frequentemente a fim de verificar se a ligação de um *insert* a um vector foi realizada de forma correta. Neste tipo de reação usam-se o conjunto de *primers* que flanqueiam o MCS do plasmídeo usado na ligação. Visto o tamanho exato deste MCS ser conhecido, caso a clonagem tenha ocorrido de forma correta o produto desta amplificação tem de ser coerente com um MCS mais o *insert* inserido.

No caso de se estar a usar células que permitam uma seleção azul/branco, as células brancas são as submetidas a este tipo de PCR. Caso a clonagem não esteja a ser realizada num plasmídeo que permita este tipo de seleção, o PCR de colónias é realizado a colónias aleatórias.

Em qualquer clonagem, recorreu-se sempre ao PCR de colónias para avaliar o sucesso da inserção da sequência de interesse. Para efetuar o *screen* cada colónia possivelmente transformante esta foi picada com um palito e ressuspensa em 50µL de água MQ estéril. A ressuspensão foi depois fervida por aproximadamente 5 min sendo posteriormente centrifugada 1 min a 9.800 xg. Na reação de PCR são então usados 15 µL deste sobrenadante. A enzima utilizada foi *Taq* DNA polimerase e os *primers* variam consoante o plasmídeo usado na clonagem, tendo sido usados os *primers* do fago T7 quando se tratava de pET28 ou pET24 e *primers* do fago M13 quando se tratava do pUC18.

Cada reação foi efectuada num volume final de 30µL com as seguintes concentrações finais de reagentes:

Quadro 16 - Composição da reação de PCR de colónias usando a *Taq* DNA polimerase.

Componente	Concentração final
Tampão ThermoPol 10X	1X
dNTPs 10 mM	200 µM cada
Primer Forward 10 µM	0,5 µM
Primer Reverse 10 µM	0,5 µM
<i>Taq</i> DNA Polimerase	0.033U/µL

O programa de termociclagem aplicado foi:

5 min	95°C	}	1 ciclo
30 seg	95°C	}	30 ciclos
45 seg	55°C		
1min por Kb	68°C		
5 min	68°C	}	1 ciclo

Os tempos de extensão foram ajustados segundo tamanho do gene cuja clonagem se queria verificar.

Os clones positivos (cuja bandas assumem o tamanho do *insert* clonado mais o poli-linker) foram mandado sequenciar pela empresa StabVida. Como *primers* de sequenciação foram usados os mesmos *primers* utilizados no PCR de colónias.

9.2. Digestões com enzimas de restrição

Digestões foram efectuadas sempre que necessário cortar uma determinada fragmento de DNA (linear ou não) de forma a originar extremidades com uma determinada sequencia e estrutura ou de forma a excisá-la de um fragmento maior.

Todos os tampões usados foram fornecidos juntamente com a enzima correspondente.

A maioria das digestões de plasmídeos e produtos de PCR foram realizadas usando concentrações de DNA de 10-40 ng/μl, a quantidade recomendada de enzima e o tampão em que a enzima apresentava maior atividade. Esta reação foi incubada 1h à temperatura óptima da enzima usada. Algumas reações tiveram de ser suplementadas com BSA visto esta ser necessária à atividade de algumas enzimas de restrição

Digestões para confirmação de clonagem foram efectuadas num volume total de 10μL, aplicando a quantidade recomendada de enzima. Digestões para clonagens foram efectuadas num volume tão grande quanto o necessário, não excedendo os 50μL, aplicando-se as unidades de enzima necessárias para digerir a quantidade de DNA presente, tendo sempre o cuidado garantir que o glicerol proveniente do tampão em que a enzima se encontra não exceda os 1:20 (5%) do volume total da reação.

No caso de digestões duplas, tem de se ter em conta a compatibilidade das enzimas nos tampões usados bem como a temperatura óptima de cada enzima.

As digestões NdeI/EcoRI e KpnI/PstI foram efectuadas em NEBuffer EcoRI e NEBuffer 1, tendo apenas o cuidado de sempre que a atividade de pelo menos uma das enzimas não fosse máxima no tampão em que a digestão foi efectuada, aumentar-se o tempo de digestão e/ou a quantidade de enzima usada.

Caso haja alguma incompatibilidade de condições é necessário recorrer a

digestões sequenciais.

Assim, as digestões usando o par SmaI/PstI, a reação foram efectuadas em tampão NEBuffer 4, adicionado primeiro a SmaI e incubando a 25°C, por 2h (devido à sua baixa atividade neste tampão). Ao fim deste período a temperatura foi aumentada para 37°C e a enzima PstI foi adicionada, incubando por 1h.

Todas as digestões foram efectuadas a fim de preparar DNA para clonagem ou como meio de confirmação de clonagem (excisão do *insert*).

Após digestão, o DNA para clonagem foi limpo usando o kit de Purificação de PCR (secção III- 9.4) e reservado para reações de ligação (secção III- 9.3). DNA cuja digestão visava a confirmação de clonagem foi aplicado diretamente em gel de agarose (secção III- 9.6).

9.3. Ligação

Ligações foram feitas sempre que necessário clonar um determinado fragmento de DNA num vector. Esta clonagem é efectuada, geralmente, visando a transformação do vector recombinante em células competentes para aplicações posteriores

Para proceder a uma ligação, num volume de 20-30µL adicionou-se 50 a 80ng de plasmídeo linearizado, o fragmento de DNA com extremidades compatíveis numa molaridade 2 a 3 vezes superior à do vector, bem como a T4 DNAligase (400U) e o tampão de reação desta enzima (fornecido com a enzima) numa concentração de 1X, perfazendo o volume com H₂O MQ estéril. A reação foi deixada a incubar durante 1h a RT. Metade desta reação foi transformada em células competente e a outra foi reservada a -20°C, caso fosse necessária nova transformação.

9.4. Purificação de DNA

O DNA foi purificado sempre que se quis isolar apenas o DNA a partir de uma qualquer reação a que este tivesse sido submetido, eliminando assim todos os contaminantes (enzimas, cofactores, etc.) para uma próxima aplicação.

Todas as purificações de DNA linear foram efectuadas recorrendo ao kit Purificação de PCR QIAquick. Todas as soluções indicadas são fornecidas como parte integrante do kit.

As centrifugações realizadas foram efectuadas a 9.800 xg.

Foram adicionados 5 volumes de tampão PB por cada volume de reação a limpar, sendo esta mistura aplicada numa coluna QIAquick e centrifugada 75seg, descartando o *flowthrough*. Este passo vai limpar já alguns componentes do meio mas visa principalmente ligar o DNA à membrana de sílica da coluna. A coluna foi depois 750µL de tampão PE, centrifugando 75seg e descartando o *flowthrough*. Este tampão limpa com maior rigor o DNA principalmente os sais que estejam presentes. Centrifugou-se a coluna de novo por 2min, passando-a

em seguida para um eppendorf de 1.5mL. Neste ponto procedeu-se à eluição do DNA que se encontrava ligado à membrana da coluna aplicando 30µL de tampão EB (Tris-HCl 10mM pH 8) e centrifugando de novo 75seg.

As amostras eluídas foram então quantificadas no Nanodrop (secção III- 9.7).

9.5. Isolamento de Plasmídeos

Isolamento de plasmídeo foi efectuado sempre que necessário obter um qualquer plasmídeo em concentração adequada a poder ser utilizado em aplicações posteriores.

De forma a isolar plasmídeo recorreu-se ao kit QIAquick Spin MiniPrep (Quiagen). Todas as soluções indicadas são fornecidas como parte integrante do kit. Com este kit efectua-se a lise celular e a captura dos plasmídeos multi-copy pelas colunas fornecidas pelo kit, sendo possível a sua eluição posterior, permitindo assim a purificação efetiva de plasmídeos.

Todas as centrifugações foram realizadas a uma velocidade de 9.800 xg.

Para tal, as células que possuem os plasmídeos foram crescidas *overnight* em meio LB suplementado com o antibiótico de resistência do plasmídeo. 6mL dessa cultura foram então centrifugados e a fracção celular ressuspensa em 250µL de tampão P1. Em seguida procedeu-se à lise celular pela adição do tampão P2, que foi deixado atuar 1-5 min, sendo esta interrompida pela adição de 300µL de tampão N3. Em seguida, centrifugou-se a reação por 10 min e aplicou-se o sobrenadante numa coluna de afinidade para DNA que foi centrifugada 75seg. Os passos anteriores visaram não só a lise celular como também a precipitação proteica. Em seguida adicionou-se 500µL de tampão PB e centrifugou-se 75seg, descartando o *flowthrough*. Aplicam-se em seguida 750µL de tampão PE, centrifugando 75seg, descartando o *flowthrough*. Centrifugou-se a coluna de novo por 2min. Estes 2 últimos passos visam garantir a limpeza do DNA extraído. A coluna é passada para um eppendorf de 1.5mL e procedeu-se à eluição do DNA que se encontrava ligado à membrana da coluna aplicando 30µL de tampão EB (Tris-HCl 10mM pH 8) e centrifugando de novo 75seg.

As amostras eluídas foram então quantificadas no Nanodrop (secção III- 9.7).

9.6. Electroforese em gel de agarose

Aplica-se a técnica de electroforese em gel de agarose para separar as molécula de DNA ou RNA, que são negativamente carregadas, segundo o seu tamanho, ou seja, de acordo com número de pares de bases. Pode ser usada para ensaios de EMSA (secção III- 11.1).

Esta técnica é aplicada, maioritariamente para confirmar a correção de amplificações e analisar resultados de digestões ou de PCR de colónias (secção III- 9.1). Foram usados géis com uma percentagem de 1 e 2% de agarose, dependendo do tamanho do fragmente a correr em gel (fragmentos até 750bp em gel de 2%, igual ou acima desse valor em géis de 1%)

Os géis de agarose foram corridos a 80V 30-60min (dependendo da percentagem de agarose do gel e do nível de resolução necessária) em TAE 1X.

A coloração deste tipo de géis foi efectuada usando o marcador de ácidos nucleicos SYBRgreen (10.000X). Este marcador foi adicionado ao gel antes da sua polimerização. Adicionou-se o composto numa concentração de 1X, agitando bem. Durante todo o processo (polimerização e corrida) o gel foi mantido protegido da luz, a fim de não ocorrer degradação do marcador fluorescente.

A revelação dos géis foi efectuada recorrendo a um transiluminador e uma câmara aliada a um software de aquisição e tratamento de imagem.

Em todas as corridas efectuadas um dos poços foi carregado com um marcador molecular de 100bp (100 a 1000bp) ou 1kB (Promega - 250 a 10.000bp; Roth - 500 a 10.000bp), dependendo da gama de resolução de pesos moleculares pretendida.

9.7. Quantificação de DNA e RNA

Para proceder à quantificação de DNA e RNA usou-se o aparelho Nanodrop 2000, que permite uma quantificação espectrofotométrica não só DNA *single e double stranded*, como de RNA e proteínas. A quantificação de DNA é efectuada a 280nm e a de RNA a 260nm. 1 a 2µL da amostra foram colocados no aparelho e a sua absorvência lida. A concentração é dada em ng/µL.

9.8. Isolamento de DNA Genómico

A fim de recolher genómico de *D. vulgaris* Hildenborough, recorreu-se ao kit Wizard® Kit de Purificação de DNA Genómico (Promega). Todos as soluções indicadas são fornecidas como parte integrante do kit.

Este kit é baseado num processo de 4 passos: lise celular e nuclear; digestão com RNase; Precipitação proteica; Concentração e precipitação do DNA.

Todas as centrifugações foram realizadas a uma velocidade de 9.800 xg.

Assim, centrifugou-se 1mL de cultura 2min, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 600µL Solução de Lise Nuclear, pipetando gentilmente para misturar. Incubou-se 5min a 80°C, arrefecendo-se depois até à RT. Adicionou-se 3µL de Solução de RNase, misturou-se e incubou-se a 37°C por 15-60min, arrefecendo depois até à RT. Adicionou-se em seguida 200µL de Solução de Precipitação Proteica, vortexando. Incubou-se por 5min e centrifugou-se 3min. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo contendo 600µL de isopropanol à RT e misturou-se. Centrifugou-se 2min e descartou-se o sobrenadante. Em seguida adicionou-se 600µL de etanol 70% à RT misturando-se. Fez-se nova centrifugação nas mesmas condições que antes, aspirando posteriormente o etanol e deixando secar por 10-15min. Aplicou-se 100µL de Solução de re-hidratação (10mM Tris-HCl pH 7.4; 1mM EDTA pH 8.0) e incubou-se 1h a 65°C ou *overnight* a 4°C.

9.9. Indução de competência

Este tipo de técnicas visa tornar artificial as membranas celulares permeáveis a moléculas de DNA externas.

A indução de competência pode ser realizada através de métodos químicos (como o método do cloreto de cálcio e do TB) ou métodos físicos (como a electroporação).

Neste trabalho apenas foram aplicados métodos químicos de indução de competência.

9.9.1. Método do TB

Deixou-se um pré-inóculo das células selecionadas em meio LB, suplementado com o antibiótico de resistência respectivo, a crescer o/n a 37°C e 150rpm. A partir deste pré-inóculo inoculou-se 25 mL de SOB (suplementado com 250µL de solução stock de MgCl₂+MgSO₄ e antibiótico) a 1% e deixou-se crescer a 37°C e a 180 rpm. Quando a OD₆₀₀=0,6, o inóculo foi colocado em gelo por 10 min, sendo seguidamente transferido para um tubo de centrifuga gelado, procedendo-se depois à sua centrifugação a 2.100xg, 10min, 4°C. O *pellet* foi em seguida ressuspensão em 8mL de tampão TB gelado, incubando em gelo por 10 min. Fez-se uma nova centrifugação a 2.100xg, 10min, 4°C e ressuspendeu-se desta vez em 2mL de tampão TB (manteve-se sempre no mesmo tubo para evitar diferenças de temperatura e pipetagem). Adicionou-se DMSO 100% à suspensão de células para uma concentração final de 7%, incubando-se em gelo por 10 min. As células foram então alíquotadas e congeladas em azoto líquido. Este método foi aplicado para a indução de competência das estirpes de *E.coli* JM109, *E.coli* JM109(DE3), *E.coli* XL1Blue.

9.9.2. Método do Cloreto de Cálcio

Inoculou-se 100mL de meio LB suplementado com o antibiótico a 1:100 (1%) a partir de um pré-inóculo.. Quando a cultura atingiu OD₆₀₀= 0,6, retirou-se 1,5mL de cultura que foi centrifugada 1min 9.800 xg. O *pellet* foi ressuspensão em 750µL de CaCl₂ 0,1M estéril bem gelado. Incubou-se 1h em gelo. Em seguida centrifugou-se de novo 1min a 9.800 xg e o *pellet* foi ressuspensão em 50µL de cloreto de cálcio. Este método foi aplicado para a indução de competência da estirpe *E.coli* K-12 LMS2710.

9.10. Transformação pelo método do choque térmico

A transformação pelo método do choque térmico visa induzir a inserção de DNA exógeno em células bacterianas competentes. Esta técnica foi aplicada sempre que necessário introduzir DNA em células para expressão, replicação ou complementação.

A uma alíquota de 50-100µL de células competentes adicionou-se, em gelo, 50-80ng de DNA, ficando a incubar em gelo no mínimo 30 min. Após este período, foi induzido o choque a 42°C, sendo a duração deste choque dependente

do tipo de células a transformar (secção III- 2.1). As células são então novamente colocadas em gelo onde ficam no mínimo 2 min. Terminada esta incubação, adicionou-se 1mL SOC (970µL SOB, 20µL Glucose 1M, 10µL MgSO₄ 1M+MgCl 1M) e incubou-se a 37°C e 180rpm por 30-60 min. Em seguida, a reação foi centrifugada 1min a 9.800 xg, descartou-se maioria do sobrenadante (~900 µL), ressuspendeu-se o *pellet* celular no volume restante e plaqueou-se em meio LA suplementado com o antibiótico específico do plasmídeo com que se fez a transformação. No caso de plasmídeos que possibilitem a seleção de transformantes pelo método do azul-branco, como é o caso do pUC18, as placas foram também suplementadas com X-Gal e IPTG (secção III- 8.5.1)

10. Expressão, purificação e ensaios de determinação de concentração de proteína

Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. Todos os passos foram realizados com as amostras em gelo.

10.1. Expressão

A expressão consiste na indução da transcrição de um determinado gene clonado num plasmídeo de expressão (passível de indução controlada) transformado numa estirpe de *E.coli* que seja também ela adequada para este fim.

Neste trabalho o gene que se pretendia expressar era o gene codificante da HcpR de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Para tal este foi clonado no plasmídeo de expressão pET28a⁺. A expressão foi testada em 3 estirpes distintas de células de *E.coli* competentes de expressão: BL21 (DE₃) Gold, BL21 pLysS Star JM109 (DE₃).

Células de expressão competentes foram transformadas com o plasmídeo onde se encontrava clonado o gene que se pretendia expressar (secção III- 9.9), e plaqueadas (secção III- 8.5.1). Após um crescimento o/n inoculou-se um pré-inóculo que foi deixado a crescer também o/n. A partir deste pré-inóculo, inóculou-se outro meio de cultura a 1:100 (1%). Este meio de cultura seria 200mL de LB, caso se tratasse de um teste de expressão e 5L de meio LB (5X1L), caso se tratasse de expressão para purificação proteica. As condições utilizadas nos ensaios de expressão proteica para purificação foram então as seguintes: cresceu-se cultura inoculada a 1:100 (1%) a 37°C, 150 rpm até esta atingir OD₆₀₀= 0,5. Neste ponto induziu-se a expressão adicionando 500µM de IPTG 1M e deixando a crescer o/n a 20°C e sob agitação (150rpm)

10.2. Purificação

O passo de purificação visa isolar a proteína de interesse que foi sobre-expressa no ensaio de Expressão. Para tal foi necessário, em primeiro lugar, recolher toda a massa celular originada durante o ensaio de Expressão,

centrifugar toda a cultura 15min a 10.000 xg. Para verificar a sobre-expressão da proteína de interesse, recolher o *pellet* referente a 1mL de cultura, ressuspensando em seguida em 25µL de H₂O MQ estéril, aplicando em seguida 10µL desta ressuspensão juntamente com o volume indicado de tampão de *loading*. 2X, fervidos por 5min e centrifugados 1min a 24.000 xg, em gel de SDS-page 12%(secção III- 10.4).

O pellet celular originado da centrifugação anterior é ressuspenso em Tampão de Ressuspensão (secção III-7.4) até a um volume máximo de 30mL (volume máximo suportado pelo aparelho de disrupção celular French Press a usar). À ressuspensão adicionou-se 1µL DNaseI 10mg/mL a fim de diminuir a viscosidade da mesma. A ressuspensão foi então submetida a 3-4 ciclos de extrusão na *FrenchPress*, sendo em seguida centrifugada 20min a 24.000 xg.

A fim de eliminar os detritos membranares existentes, o sobrenadante anterior foi submetido a uma Ultra Centrifugação 2h a 200.000 xg. O sobrenadante resultante desta centrifugação, também denominada fase solúvel foi recolhida e 10µL aplicados em gel. É nesta fase que se espera que esteja localizada a grande maioria da proteína sobre-expressa. Se necessário confirmar a presença da proteína nesta fração, pode picar-se um pouco do *pellet* referente à fracção de interesse e tratá-lo como referido atrás para verificar a sobre-expressão.

Todas as fases subsequentes foram efectuadas já em anaerobiose. Assim, todos passos seguintes foram realizados no interior de câmara anaeróbia.

Visto ter sido inserida um cauda de histidinas N-terminal à proteína, é possível tirar proveito do facto de o aminoácido histidina formar complexos com um número de catiões (Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ e Fe³⁺). Assim, através de uma cromatografia de afinidade de metais imobilizados (IMAC – Immobilised Metal Affinity Chromatography) foi possível purificar esta proteína. Mediante a aplicação da proteína numa coluna Chelating Sepharose Fast Flow manual (coluna catiónica) a que se tenha ligado *a priori* Ni²⁺. Esta coluna apresenta assim afinidade para a cauda de histidinas presente na proteína, ficando esta assim complexada e retida na coluna até a passagem de um tampão de eluição. O imidazole presente em cada um dos tampões de eluição (sempre em concentração crescente) irá competir com a ligação ao níquel causando a eluição da proteína que se encontrava ligada à matriz da coluna.

O volume total de fase solúvel foi então passado por um filtro G45 para proteínas com 0,45µm de poro, e em seguida aplicado numa coluna *Chelating Sepharose Fast Flow* (10cm, 300cm/h, XK50/30, 100kPa) previamente lavada com H₂O MQ estéril, equilibrada com Binding Buffer desarejado.

Em seguida aplicou-se sucessivamente 20mL de cada um dos tampões de eluição *Wash I*, o *Wash II*, o *Wash III* e *Elute*, também eles desarejados. Cada tampão foi aplicado após passagem de um volume igual do tampão aplicado antes. A proteína de interesse deverá sair maioritariamente em uma das fracções, sendo essa a submetida ao processo de concentração. Ocorrendo a

distribuição da proteína por mais que uma fracção, pode ser vantajoso concentrar mais que uma fracção bem como juntar várias fracções e concentra-las como um todo.

A localização da proteína é determinada aplicando 10µL de cada fracção em gel de SDS-page 12% (secção III- 10.4). A amostra é primeiro fervida 5min já com *loading Buffer* e centrifugada 1min a 9.700 xg.

A coluna foi ainda submetida à passagem de 20mL Strip Buffer (secção III- 7.4) e H₂O estéril de forma a eluir todas as impurezas, sendo reservada a 4°C com etanol 20%.

A concentração das amostras foi efectuada através do uso de células de ultrafiltração com agitação com uma membrana cujo *cut-off* era 10kD (Amicon) até a um volume mínimo de 3,5mL. Sempre que necessário concentrar em volumes menores foram usadas colunas *NanoSep* com uma membrana Omega de *cut-off* de 10kD (Sigma).

Todo o processo de purificação foi efectuado em gelo, mantendo sempre amostra a uma temperatura nunca acima dos 4°C.

10.3. Quantificação

Para quantificar proteína aplicou-se o método de BCA. Esta técnica usa o ácido bicincônínico como quantificação colorimétrica para a quantificação total de proteína de uma amostra. Este método baseia-se na redução do Cu²⁺ a Cu⁺ pelas proteínas num meio alcalino. O Cu⁺ complexa com o BCA (*Bicinchoninic acid*) formando quelatos solúveis em água e coloridos cuja absorvência pode ser medida no seu ponto máximo a 562nm.

A fim de determinar o volume total de reagente necessário para todas as amostras aplicou-se a seguinte fórmula

$$(\# \text{ Standards} + \# \text{ amostras}) \times \# \text{ réplicas} \times \text{vol. reagente por amostra}$$

O ensaio foi realizado em placa.

Para a recta de calibração foram usadas as concentrações 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 e 2 mg/mL de Proteína Padrão. Recta de calibração foi elaborada, pelo menos em duplicado, em cada ensaio de quantificação.

Cada standard ou amostra tem um volume total de 25µL. A cada um foram adicionados 200µL de Reagente de BCA (mistura de reagente A com reagente B numa proporção de 1:50). A placa foi tapada e incubada 30min a 37°C. Foram lidas as absorvências a 562nm.

Usaram-se os valores standards para efetuar uma curva de calibração. Através do cruzamento dos valores de absorvência das amostras com a curva de calibração determinou-se a concentração proteica das nossas amostras.

10.4. Electroforese em gel de SDS-Page

A técnica de electroforese em gel de SDS-page, é uma electroforese em condições desnaturantes, sendo predominantemente aplicada sempre que se pretende separar proteínas segundo o seu peso molecular. Serve para avaliar a presença de uma proteína específica e o nível de concentração da amostra (de forma aproximada). Contudo, esta técnica pode também ser aplicada como método de separação de moléculas de DNA e RNA segundo o seu peso molecular.

Neste trabalho esta técnica foi aplicada como método de confirmação de sobre-expressão e localização proteica, bem como método de determinação experimental do peso molecular da proteína de interesse.

Cada gel de SDS-page era constituído por duas fases: fase de concentração (6% Acrilamida) (primeiro terço do gel) e fase de resolução (12% Acrilamida) (últimos dois terços do mesmo).

Às amostras do adicionado Loading Buffer na concentração adequada (1X), sendo posteriormente fervidas por 5 min. Estas foram então aplicadas no gel recorrendo a uma seringa de vidro.

Os géis de SDS foram corridos a 150V, em Running Buffer. A corrida foi terminada antes de qualquer amostra sair do gel.

A fim de revelar estes géis, procedeu-se à sua incubação em Solução Corante por 30min. Este passo cora a totalidade do gel. A fim de descorar a matriz do gel, deixando apenas coradas as proteínas nele corridas, foi necessário uma incubação posterior de 15-30min em Solução Descorante.

11. Electrophoretic Mobility Shift Assay

A técnica de *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA), também conhecida por retardação em gel ou ensaio de *shift* de banda é uma forma rápida e sensível de detectar a ligação de proteínas a sequencias específicas de DNA. Havendo ligação da proteína a um determinado fragmento de DNA, este complexo vai ver a sua mobilidade em gel reduzida, resultando numa deslocalização da banda característica do dito fragmento^{[54][75]}.

11.1. Em gel de agarose

EMSA em gel de agarose apresentou-se como uma técnica mais simples que a sua homónima em géis de acrilamida, permitindo uma análise preliminar de um possível *binding*.

Foram feitas, em gelo, reacções em 20-30µL contendo o tampão de *binding*, o DNA e a proteína. As razões DNA/proteína testadas foram 1:100, 1:200 e 1:400. A quantidade de DNA mínima aplicada foi de 100ng. A reacção foi deixada a incubar 1-16h a 37°C sendo posteriormente aplicada num gel de agarose 2% com 25mL de volume. O gel foi então corrido em tampão TAE 1X por 30-60min e revelado.

Por cada reação de *binding* referente a cada uma das zonas promotoras, foi feita uma reação a que não se adicionou proteína, de forma a termos a reação controlo.

11.2. Em gel de acrilamida não desnaturante

EMSA em géis de acrilamida foi aplicada visando um maior poder de resolução que a técnica homónima em géis de agarose, bem como a possibilidade da aplicabilidade de técnicas de detecção de maior sensibilidade, permitindo assim, em simultâneo, a utilização de quantidades menores de DNA e Proteína e um maior limite de detecção.

Todo o ensaio de EMSA foi efectuado recorrendo ao kit DIG Gel Shift, 2nd Generation (Roche)^[49]. Todas as soluções indicadas foram fornecidas como parte integrante do kit sendo a exceção as soluções necessárias para a produção do gel de acrilamida não desnaturante polimerizado no laboratório.

Ao longo dos ensaios foram usados géis de acrilamida 6% *pre-casted* comerciais (Novagen) bem como géis não desnaturante polimerizados no laboratório, tendo sido usados em ocasiões diferentes géis de 6% e 8% na busca de uma maior resolução. Em cada ensaio foi sempre registada a natureza do gel em que as amostras foram corridas. Descreve-se a baixo a constituição dos géis polimerizados no laboratório (secção III- 11.2.2)

11.2.1. Marcação DNA

Visto não ser possível a detecção de DNA sem que este se encontre de alguma forma marcado, para se poder observar a migração *standard* de um determinado fragmento bem como a sua (possível) mobilidade reduzida, é necessário proceder à sua marcação. Esta marcação convém que seja o mais sensível possível de forma a que qualquer pequeno retardamento do fragmento em causa seja detectável. Aqui recorreu-se à marcação 3' com DIG-ddUTP que, mediante um processo posterior de revelação, resulta na emissão de quimioluminescência que permite uma detecção altamente sensível^{[43][62][115]}.

A fim de proceder à marcação das zonas promotoras, a 3.9 pmol de oligonucleótido adicionou-se água MQ estéril perfazendo um volume final de 10µL. Em seguida, em gelo adicionou-se:

Quadro 17 - Composição da reação de marcação 3' do DNA com ddUTPs usando a Terminal Transferase

Reagente	Concentração final
Tampão de marcação 5X	1X
Solução de CoCl ₂ 25mM	5 mM
DIG-ddUTP	0,05 mM
Transferase terminal	20 U/µL

Submeteu-se esta reação a um *spin* rápido e incubou-se a 37°C(banho) por 15min, colocando-se de seguida em gelo. A reação foi parada adicionando 2μL EDTA 0,2 M (pH 8.0). Prefez-se com água bidestilada até a um volume de 77μL, obtendo-se assim uma concentração final de 0,05 pmol/μL para o oligonucleótido marcado.

Após a primeira marcação, foram feitas diluições sucessivas do DNA marcado, aplicando 1μL de cada diluição numa membrana, que foi submetida a fixação e a revelação a fim de determinar o limite de detecção atingido.

11.2.2. Ensaio de *Binding*

As reações de binding foram efectuadas em anaerobiose, numa câmara anaeróbica em que o O₂ não excedia as 2. ppm. Todos os componentes externos ao kit foram desarejados sob fluxo de azoto. As reações foram efectuadas como mostra a tabela.

Quadro 18 – Composição geral das reações de binding efetuadas. Apresenta-se também a composição dos ensaios de competição

			Competição	
	Controlo	Binding	Específica	Inespecífica
Binding Buffer	1X	1X	1X	1X
Poli [d(I-C)] [0.1μg/μL]	0.1μg	0.1μg	0.1μg	0.1μg
Poli lisina [0.1μg/μL]	0.1μg	0.1μg	0.1μg	0.1μg
DNA marcado [0,05pmol/μL]	0,05pmol	0,05pmol	0,05pmol	0,05pmol
Regulador	–	50 a 200 pmol [2.5 a 10μM]	100 pmol [5μM] ^{[101][66]}	100 pmol [5μM] ^{[101][66]}
DNA não marcado				
Igual ao marcado [41][105]	–	–	100-200 fold (sonda)	–
Outra região [41][105]	–	–	–	200-300 fold (sonda)
V_{total}	20μL	20μL	20μL	20μL

Os volumes até aos 20μL foram feitos com H₂O MQ estéril.

Foram realizados também ensaios de competição específica e inespecífica. Estes testes baseiam-se na adição às reações de DNA não marcado, para determinar qual a sua influência no *binding*. Na competição Inespecífica, o DNA usada como competidor terá de ser qualquer DNA para que o regulador não apresente afinidade. Na competição específica o competidor adicionado é igual a sonda usada no ensaio de binding, com a única diferença de não se encontrar marcado. Estes competidores são adicionados sempre em excesso em relação a sonda marcada (100-250 vezes mais) de forma a garantir que o efeito causado

seja facilmente observável. Numa reação de *binding* que ocorra especificamente para uma determinada sequência de DNA, o espectável é:

- **Competição Inespecífica**^{[41][63]}: não ocorrer alteração do efeito observado (sem alteração da intensidade das bandas). Isto ocorre pois caso o regulador se ligue especificamente à sonda usada, ao se adicionar outro fragmento para que este não tenha afinidade, este irá ligar-se apenas à sonda marcada (para a qual tem de facto afinidade) e não ao DNA não marcado. Assim, as bandas apresentadas serão as mesmas e apresentarão a mesma intensidade que as apresentadas na reação de *binding* em que o competidor inespecífico não foi adicionado. Pelo contrário se esta ligação não for específica, o regulador irá ligar a qualquer fragmento de DNA adicionado, verificando-se assim redução da intensidade da banda de posição alterada e um enriquecimento da sonda livre, uma vez que parte da proteína irá ligar o DNA não marcado e não a sonda.

Competição Específica^{[41][63]}: ocorrer diminuição, se não mesmo desaparecimento, da banda de posição alterada com o consequente enriquecimento da banda referente à sonda livre. Tal efeito é explicado pois, ao se adicionar DNA igual à sonda mas que não se encontre marcado (sonda fria), caso o regulador tenha afinidade específica para ambas, este irá ligar-se também à sonda fria, verificando-se então assim diminuição da intensidade (ou mesmo o desaparecimento) da banda de posição alterada com o respectivo aumento de intensidade da sonda livre, uma vez que parte da proteína que está a causar a alteração da mobilidade ligou sonda que não emite sinal e a sonda marcada que era anteriormente ligada, migra agora sem retardamento.

As reações foram incubadas, ainda em anaerobiose, à RT por 15 a 20 min. Em seguida foram colocadas em gelo e aplicadas em gel de acrilamida não desnaturante.

11.2.3. Electroforese em gel de acrilamida não desnaturante

O princípio de uma electroforese em gel de acrilamida não desnaturante, ou seja, em condições nativas, é um pouco diferente da sua versão SDS-page. Neste tipo de técnica, não se adiciona qualquer tipo de agente desnaturante ou agente polarizador da amostra. Consequentemente, em vez de uma molécula que retém apenas a sua estrutura primária e predominantemente carregada negativamente, temos uma molécula que retém a sua estrutura quaternária e a sua carga nativa. Visto tratar-se de uma molécula com propriedades completamente distintas, esta vai agora migrar segundo a sua carga nativa e o seu volume hidrodinâmico, isto é, a sua conformação. Embora esta técnica se aplique também para electroforeses de proteína, são também usados para correr moléculas de DNA e RNA. Visto permitir também este tipo de separação e não envolver qualquer tipo de agente desnaturante, torna-se também a técnica indicada para analisar *binding* proteínas a sequências de DNA. Numa situação destas, forma-se um complexo DNA-proteína que apresenta uma carga e volume hidrodinâmico próprios e portanto também o seu padrão de migração. Isto leva a uma migração diferencial (mais lenta) do complexo em relação ao DNA isolado. O que se verifica é então um *shift* da banda correspondente à reação de *binding*.

Quadro 19 – Composição dos géis de acrilamida não desnaturantes polimerizados no laboratório. Apresentada a composição dos géis de 6% e dos géis de 8% de acrilamida.^{[43][111]}

% Acrilamida	6	8
Acrilamida/Bisacrilamida (37.5:1) 30%	1,6 mL	2.133mL
TBE 10x	400µL	400µL
APS 10%	54µL	54µL
TEMED	5.4µL	5.4µL
H₂O	4.85 mL	5.4 mL
V_{total}	8 mL	8mL

Independentemente da origem do gel, o tratamento aplicado em seguida foi universal.

Antes de aplicar as amostras, os géis foram sujeitos a um *Pre-run* de forma a haver estabilização da corrente ao longo do gel.

Todas as corridas em gel foram efectuadas a 4°C durante 30 a 60 min a 100 V em tampão TBE 0.25X.

Após *pre-run*, adicionou-se às amostras a quantidade indicada de Tampão de *Loading* fornecido pelo kit e estas foram aplicadas em com uma seringa de vidro.

Os géis foram então corridos nas mesmas condições que aplicadas no *pre-run*, mas desta vez por um período de 1h15min a 1h45min dependendo da percentagem de acrilamida do gel e do nível de resolução desejada.

11.2.4. Transferência DNA para membrana

Visto a detecção da quimioluminescência não ser possível em gel, é necessário proceder à transferência do DNA para uma matriz que permita tal detecção. Usaram-se então membranas de nylon positivamente carregadas. Para proceder a esta transferência foi necessário proceder a um *blotting*. Assim, colocaram-se 3 camadas de papel Whattman 3 MM, previamente mergulhado em TBE 0.25X (tampão de transferência), sobre o aparelho de *blot*. Sobre esta camada colocou-se a membrana de nylon positivamente carregada previamente equilibrada durante 5 a 15 min no tampão de corrida (TBE 0,25X). Colocou-se sobre a membrana o gel, tendo o cuidado de registar a orientação dos poços.

Sobre o gel colocou-se de novo 3 camadas de papel Whattman 3MM também mergulhado em TBE 0.25X. Com uma vareta de vidro retirou-se o excesso de tampão de transferência, usando o utensílio como um rolo.

Retirou-se também o excesso de tampão de transferência agora sobre o aparelho de *blotting*.

Correu-se o *blot* durante 30 min a 50 mA.

Colocou-se a membrana no aparelho de *UV-crosslinking* a fim de fixar o DNA à membrana. Sujeitou-se cada uma das suas faces a 2 ciclos de exposição no modo “AutoCrossLink”.

11.2.5. Revelação da membrana

Embora o DNA se encontre já marcado com DIG-ddUTP, estes não emitem quimioluminescência por si só. Foi necessário proceder à incubação com um anticorpo específico para estes nucleótidos. Este anticorpo tem, por sua vez, conjugada uma fosfatase alcalina que permite a desfosforilação do reagente fenil fosfato Dissódio 3-(4-metoxispiro {1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro) tríciclo [3.3.1.13,7] decan}-4-il) (CSPD), que quando desfosforilado resulta na emissão de quimioluminescência. Visto esta emissão ocorrer apenas onde a fosfatase alcalina está localizada, é possível detectar a localização do DNA.

A fim de revelar a membrana foi necessário lavá-la 1 a 5 min em Tampão de Limpeza, incubando em seguida em 10mL de Solução de Bloqueio 1X por 30min. Em seguida esta foi incubada também 30 min com 10mL de Solução de Anticorpo. A membrana sofreu, em seguida, 2 ciclos de lavagem com Tampão de Lavagem de 15min cada seguido de 2 a 5 min em Tampão de detecção a fim de a equilibrar.

A membrana foi então colocada sobre uma folha de acetato com a face superior da membrana para cima. Sob a membrana foi aplicado 500µL de CSPD (100µg/mL) tendo havido o cuidado de o espalhar o mais homogeneamente sobre a mesma, sobretudo nas zonas onde se espera que os oligonucleótidos surjam.

Colocou-se outra folha de acetato sobre a membrana tendo, mais uma vez, o cuidado de que a disposição do CSPD seja o mais homogênea possível.

Incubou-se por 5 min à RT, protegendo da luz, retirando após este período o excesso de líquido e unindo as extremidades das duas folhas de acetato em todas as extremidades de forma selar a membrana entre elas. Em seguida, incubou-se por 10 min a 37°C de forma a aumentar a reação de luminescência.

A aquisição de imagem foi depois efectuada Chemidoc XRS⁺ (Biorad) fazendo uma aquisição de 15 em 15 min durante período um período máximo de 2h45min.

12. Isolamento RNA

O isolamento de RNA total é uma técnica preparativa, que funciona como o ponto de partida para aplicações posteriores (produção de cDNA, RT-PCR, etc.). Estas aplicações prendem-se principalmente estudos transcriptómicos, em que se procura averiguar os níveis de expressão de determinados genes.

Aqui, esta técnica foi aplicada como preparação para a produção de cDNA (secção III-13) a partir do RNA existentes no WT e no mutante *hcpR* de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (JW9011)

Para o isolamento do RNA recorreu-se ao kit RNeasy Mini (Qiagen)^[36]. Todas as soluções indicadas foram fornecidas como parte integrante do kit à excepção da solução de paragem e do tampão TE (secção III- 7.5).

A fim de efetuar o isolamento do RNA total de uma cultura de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough foi necessário, em primeiro lugar, proceder ao crescimento e isolamento celular. Para tal foi efetuou-se um crescimento num

frasco de 100mL contendo 50mL de LS4D desarejado. Quando a cultura atingiu a $OD_{600}=1$, as células foram recolhidas centrifugando 20 min a 1.800 xg (4°C) (à cultura adicionou-se solução de paragem (secção III-7.5) numa razão de 1:14 (v/v)). É necessário ter o extremo cuidado de lavar bem todos o material com etanol 75% a fim de eliminar quaisquer contaminantes que pudessem contribuir para degradação do RNA (como RNases ou mesmo células bacterianas). Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante e congelou-se rapidamente o *pellet* celular em azoto líquido, podendo este *pellets* ser então reservado a -80°C-.

Para o isolamento do RNA em si, ressuspendeu-se o pellet bacteriano em 200µL de tampão TE contendo 15mg/mL de lisozima e incubou-se 10min à RT, vortexando durante 10seg de 2 em 2min. Em seguida foram adicionados 700µL de tampão RLT (contendo β-Mercaptoetanol numa proporção de 10µL/mL) vortexando vigorosamente. Adicionou-se 500µL de etanol 96-100% gelado ao lisado e ressuspendeu-se o mesmo por pipetagem. Esta reação foi aplicada numa coluna com membrana de sílica fornecidas pelo kit RNeasy Mini (Qiagen) (volume máximo aplicável de 700µL), centrifugando durante 15seg a 6.700 xg e descartando o *flow-through*. Adicionou-se à coluna 350µL de tampão RW1 e centrifugou-se por 15seg a 6.700 xg, descartando-se novamente o *flow-through*. Adicionou-se a 70µL de tampão RDD, 10µL de DNaseI, e centrifugou-se rapidamente, sendo depois esta solução (80µL) aplicada novamente na coluna, deixando-se incubar por 15min à RT. Em seguida adicionou-se 350µL de tampão RW1, e fez-se nova centrifugação de 15seg a 6.700 xg. Neste ponto, substitui-se o tubo colector da coluna. Pipetou-se 500µL de RPE, e voltou-se a centrifugar 15seg a 6.700 xg, descartando o *flow-through*. Voltou-se a adicionar o mesmo volume de RPE seguido de nova centrifugação, desta vez 2min à mesma velocidade. Colocou-se a coluna num eppendorf de 1.5mL e eluiu-se o RNA com tampão TE: 1ª eluição - 50µL; 2ª eluição - 30µL; 3ª eluição - 10µL. As amostras foram então corridas em gel para verificar o estado do RNA (secção III- 9.6).

Para que possa ser feita uma avaliação da expressão de um determinado gene a partir do mRNA isolado, é necessário garantir que este não se encontra contaminado com DNA. Isto explica-se pelo facto de esta análise ser efectuada por PCR como cDNA obtido por retrotranscrição do RNA isolado. Ora, caso o RNA esteja contaminado com DNA, o cDNA sintetizado, também irá estar. Ao efetuar-se o PCR com o cDNA, obteremos produtos de amplificação que surgiram por amplificação não do cDNA sintetizado, mas sim do DNA contaminante, o que faria com que os resultados obtidos não fossem assim o reflexo do transcriptoma da célula. Isto tornou necessário a incubação do RNA isolado com DNaseI de forma a proceder à digestão de qualquer DNA presente.

Fez-se então, em seguida um nova incubação do RNA com DNaseI a fim de garantir a eliminação de DNA contaminante. Para tal, usou-se o kit de limpeza de RNA Ambion® RNA Turbo DNA-free (Invitrogen) . Primeiro, fez-se uma quantificação do RNA. Pipetou-se o volume correspondente a aproximadamente 20µg de RNA, DNaseI, Tampão 1X, perfazendo o volume até 40µL com H₂O RNase-free e incubou-se 35min a 37°C. Adicionou-se o inibidor da DNaseI, incubou-se 5min à RT, centrifugando-se de seguida 90seg a 10.000 xg. Reservou-

se o sobrenadante, fração onde se encontra o RNA. Voltou-se a correr as amostras em gel de forma a confirmar a integridade do RNA (secção III- 9.6).

13. Produção de cDNA

A fim de produzir cDNA a partir de uma amostra de RNA, recorreu-se ao Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche). Todas as soluções indicadas foram fornecidas como parte integrante do kit. Adicionaram-se 4µg de RNA purificado com DNAaseI (secção III- 12), primer hexamero aleatório (hexómeros que correspondem a todas as combinações possíveis de nucleótidos- 4⁶- garantindo que há emparelhamento com o RNA, e sendo assim possível ocorrer a retrotranscrição) 60µM perfazendo o volume total (11.4µL) com H₂O PCR-grade. No termociclador, incubou-se a reação a 65°C por 10min, arrefecendo imediatamente em gelo. Adicionou-se o Reverse Transcriptase High-Fidelity Reaction Buffer 1X (MgCl₂ 8mM), Inibidor RNase protector, mix de oligonucleótidos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) 1mM (cada) fornecida pelo kit; DTT 5mM e transcritase reversa de alta fidelidade, perfazendo um volume total de 20µL. Misturou-se bem e, no termociclador, incubou-se a reação 30 min a 45-55°C, seguida de uma incubação de 5min a 85°C para inativar a transcriptase reversa. Meteu-se o tubo em gelo. Neste ponto, a reação pode ser reservada entre -15 a -25°C. Neste tipo de reação considera-se que todo o RNA foi retrotranscrito, originando assim cDNA na mesma molaridade.

Capitulo IV – Resultados e Métodos

1. Determinação do efeito do Oxigénio, Peróxido de Hidrogénio e Nitrato na viabilidade dos mutantes $\Delta hcp1$, $\Delta hcp2$ e $\Delta hcpR$ de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Dados bibliográficos descrevem a Hcp de *Escherichia coli* como sendo induzida pelo peróxido de hidrogénio bem como estando envolvida na proteção contra o stress oxidativo. Trabalhos anteriores com *Hybrid Cluster Proteins*, tanto de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough como de outros organismos, mostraram a ocorrência de uma sobre-expressão dos genes que as codificam quando o organismo é exposto a stress com nitrito.

Isto levou-nos a pensar que as Hcp's codificadas no genoma de *D. vulgaris* Hildenborough, pudessem também ter algum papel na resposta a este tipo de agente stressante.

Neste sentido fomos averiguar qual o papel dos genes *hcp1* e *hcp2*, que codificam as *hybrid cluster proteins* de *D. vulgaris* Hildenborough na defesa contra o stress pelo peróxido de hidrogénio bem como pelo oxigénio .

A fim de verificar se as estirpes de mutantes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough usadas pelo nosso laboratório apresentavam a sensibilidade esperada para mutantes nos genes que de alguma forma estão envolvidos na resposta a este tipo de stress, fomos avaliar o seu crescimento na presença de nitrito.

Um outro objectivo era aferir qual a função destes dois genes neste microrganismo uma vez que codificam proteínas com elevado grau de similaridade(47%).

1.1. Efeito do Peróxido de Hidrogénio na viabilidade dos mutantes $\Delta hcp1$, $\Delta hcp2$ e $\Delta hcpR$.

Para averiguar se de facto os genes que codificam as Hcp's do organismo em estudo estão de alguma forma envolvidos na resposta ao stress pelo peróxido de hidrogénio, procedeu-se à indução de stress usando este composto em células de *D. vulgaris* Hildenborough mutadas nos genes *hcp1* ou *hcp2*.

Começou por se averiguar qual o comportamento das estirpes perante um nível de stress mais baixo. Assim foram testadas as concentrações de 150 e 500 μ M, mas verificou-se estas concentrações não afectavam o crescimento celular. Foi também testado 750 μ M de peróxido, seguindo as OD da cultura líquida (Figura 10) e efetuando plaqueamentos 6h após a indução do stress (2 volumes de inóculo - 5 e 7 μ L) (Figura 11) . Em cada ensaio foram efetuadas no

mínimo 3 réplicas independentes, à exceção do ensaio com $\Delta hcpR$ que resulta de apenas uma réplica.

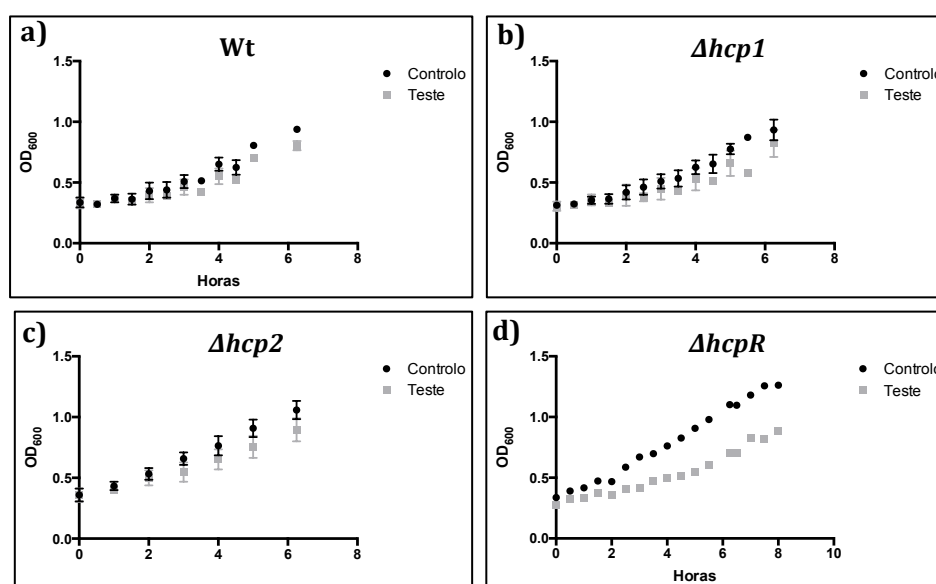


Figura 8- Crescimento anaeróbico do Wt e de mutantes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough expostos a 750 μ M de H_2O_2 . . Controlo- sem adição de H_2O_2 ; Teste - H_2O_2 750 μ M. a) *Wilde-type*, b) Mutante $\Delta hcp1$ (Dvu2013). c) Mutante $\Delta hcp2$ (DVU2543). d) Mutante $\Delta hcpR$ (DVU2547).

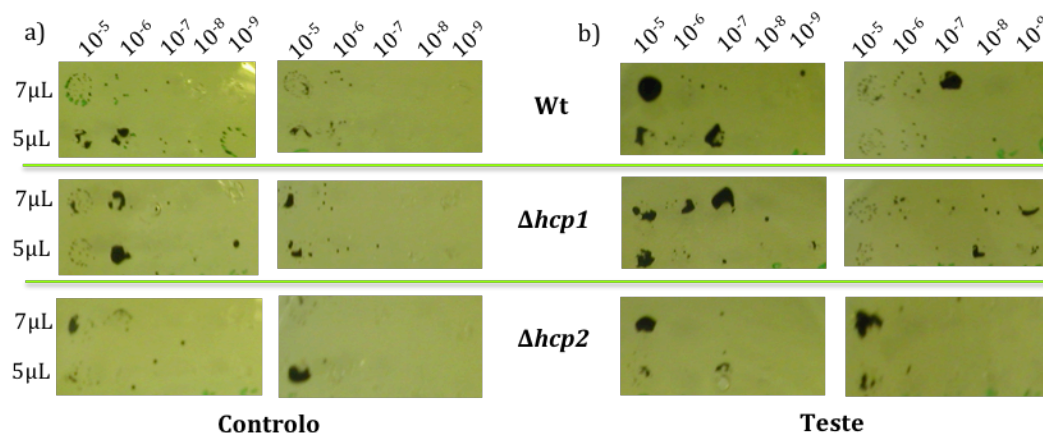


Figura 9 - Spots realizados ao Wt e a mutantes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough exposto a 750 μ M H_2O_2 6h indução de stress. Controlo- sem adição de H_2O_2 ; Teste - H_2O_2 750 μ M. a) Wt, $\Delta hcp1$ e $\Delta hcp2$ sem qualquer tipo de stress. b) Wt, $\Delta hcp1$ e $\Delta hcp2$ 750 μ M H_2O_2 . Para cada uma das estirpes apresentam-se 2 réplicas. Em cada réplica apresentam-se duas linhas de diluição: a superior em que foi aplicado 7 μ L de amostra e a inferior em que foi aplicado 5 μ L de amostra

Observando estes crescimentos verificamos que o Wt sofre uma diminuição mínima da viabilidade perante esta concentração de peróxido. Os mutantes, por sua vez, são também apenas ligeiramente afectados (embora o impacto observado seja superior ao observado para o Wt). Nos plaqueamentos em Spot efectuados ao fim de 6h observaram-se maiores crescimentos celulares em diluições superiores e em diluições mais baixa falta de correspondência de diluições entre réplicas. Não foi possível por isso tirar qualquer conclusão.

Observamos para o Wt uma diferença na viabilidade quando este é exposto a 750µM de H₂O₂. Para os mutantes $\Delta hcp2$ e $\Delta hcpR$, tal como nos crescimentos líquidos, não foi observado qualquer decréscimo da viabilidade.

Verifica-se assim que para esta concentração de peróxido não existe diferença entre a viabilidade do Wt e dos mutantes.

Em seguida avaliou-se o efeito da adição de 1mM de H₂O₂ ao meio de cultura. Assim, quando a cultura atingiu a OD₆₀₀=0,3, o stress foi induzido. Esta OD₆₀₀ foi selecionada como ponto de indução de stress, uma vez que garantimos assim que estamos no início da fase exponencial, e que portanto, qualquer efeito na viabilidade celular terá um maior impacto (Figura 8). Para avaliar o efeito desta concentração de elemento stressante foi feito o plaqueamento ao fim de 1 e 2h após indução do stress (Figura 9). Foram efetuadas no mínimo 2 réplicas independentes para cada ensaio.

A nível das OD, observamos um crescimento praticamente nulo para as estirpes que foram submetidas ao stress.

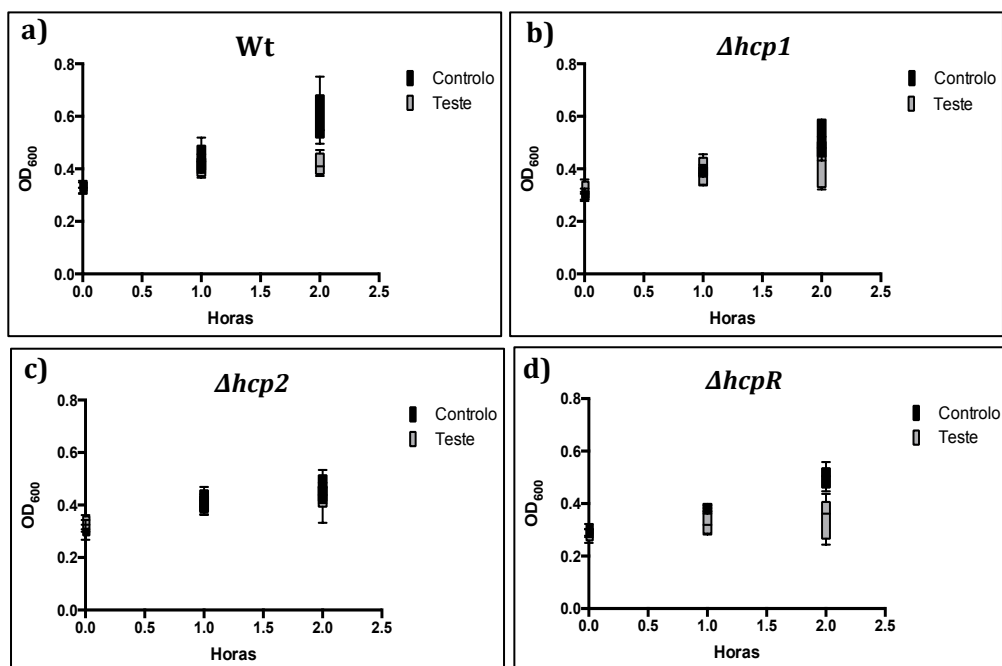


Figura 10 – Densidades ópticas médias de crescimentos anaeróbios de mutantes de *D. vulgaris Hildenborough* sob stress com 1mM de H₂O₂. Controlo- sem adição de H₂O₂; Teste - H₂O₂ 1mM. Representadas as OD₆₀₀ aquando da indução do stress, bem como 1 e 2 horas depois. a) Wilde-type, b) Mutante $\Delta hcp1$ (Dvu2013). c) Mutante $\Delta hcp2$ (DVU2543). d) Mutante $\Delta hcpR$ (DVU2547).

Observa-se também que o crescimento da estirpe $\Delta hcp2$ mesmo na ausência de stress não foi também significativo.

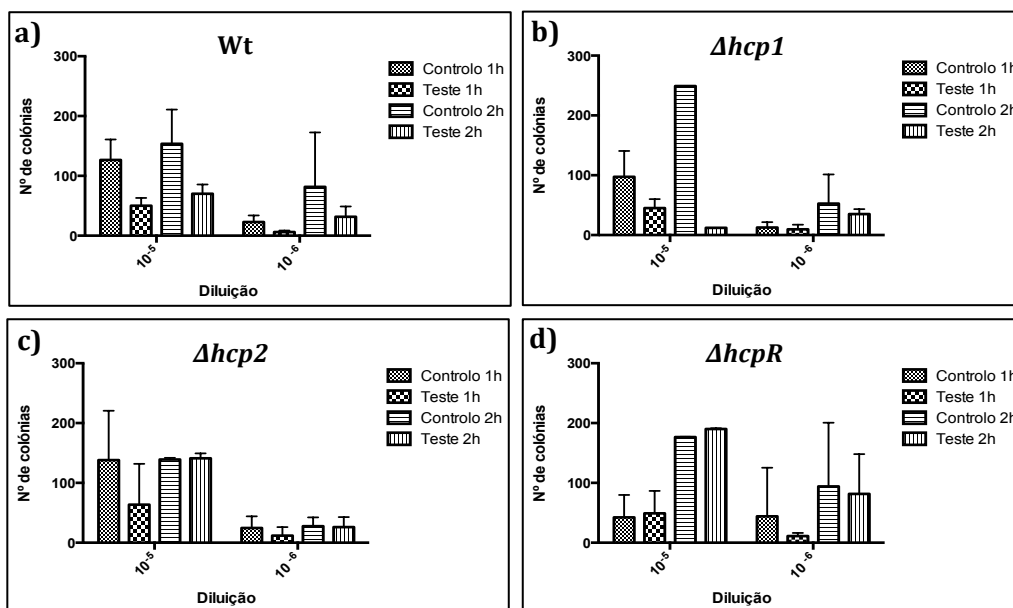


Figura 11 – Representação gráfica da contagem de CFU's realizadas ás estirpes mutantes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough 1 e 2 horas após a indução de stress com 1mM de H₂O₂. . Controlo- sem adição de H₂O₂; Teste - H₂O₂ 1mM. a) Wilde-type, b) Mutante *Δhcp1* (Dvu2013). c) Mutante *Δhcp2* (DVU2543). d) Mutante *ΔhcpR* (DVU2547).

Ao nível das CFUs efectuadas nos tempos referidos, observamos que não ocorreram diferenças significativas na viabilidade dos conjuntos controlo e teste.

Pela análise dos resultados, verificamos que 1mM de H₂O₂, é uma concentração que inviabiliza o crescimento do organismo. De facto, para a estirpe Wt, não existe uma diferença significativa entre o número de células contadas 1 e 2h após a indução do stress ao Wt. Contudo, para o mutante *Δhcp1*, diferenças foram observadas. A ausência deste efeito no crescimento líquido pode dever-se ao curto período em que as OD das culturas líquidas foram seguidas. Visto tratar-se de um organismo de crescimento lento, mesmo na ausência de stress o seu crescimento é lento, logo, qualquer efeito só será visível se se der o tempo suficiente para esta cultura desenvolver. Com este facto pode estar também relacionado o comportamento de *Δhcp2*, em que não parece haver diferença de viabilidade dos conjuntos controlo e teste, uma vez que esta estirpe apresenta, mesmo na ausência de stress, um tempo de duplicação longo, não se obtendo assim uma resolução adequada. Ao nível dos plaqueamento, visto a incubação ser bastante longa (2-3 dias), as estirpes que nos crescimentos líquidos apenas não cresceram devido à limitação do tempo de incubação têm agora oportunidade para o fazer. As estirpes que pelo contrário viram a sua viabilidade comprometida irão apenas desenvolver-se em função da gravidade do dano causado.

Para averiguar se o observado nas CFUs as 2h para o mutante *Δhcp1* com 1mM de peróxido refletia um fenótipo real, diminui-se a intensidade de stress,

aumentou-se o período de seguimento de OD e efetuaram-se plaqueamentos mais tardios. Observou-se a diminuição da severidade do stress, no entanto, mesmo 6h após o stress, não surgem diferenças de viabilidade significativas.

Assim não é observável qualquer diferença de fenótipos entre Wt e mutantes em qualquer uma das condições testadas.

Em conclusão, pela avaliação da resposta dos Wt e dos mutantes ao H₂O₂, todos os dados apontam para uma ausência de fenótipo, não estando portanto as Hcp's envolvidas na resposta ao peróxido de hidrogénio.

1.2. Efeito do oxigénio na viabilidade dos mutantes $\Delta hcpR$, $\Delta hcp1$ e $\Delta hcp2$

Afim de avaliar o papel dos genes referidos na resposta ao stress pelo oxigénio de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, fomos expor os mutante $\Delta hcp1$ e $\Delta hcp2$ ao oxigénio atmosférico e comparar as suas viabilidades em relação à estirpe selvagem. O mutante $\Delta hcpR$ foi também sujeito a este tipo de ensaios.

Para tal, começou por se proceder a crescimentos anaeróbios das culturas e à OD₆₀₀ de 0,3 induziu-se o stress. Neste momento, para cada uma das estirpes, eram selecionados frascos controlo e teste, sendo o grupo teste exposto ao ar (oxigénio atmosférico aproximadamente 21%) e incubado a 37°C sob agitação; o grupo controlo foi incubado a 37°C anaerobicamente sem agitação.

Verificou-se que a exposição ao oxigénio nestas condições era letal, ocorrendo lise celular, que se traduzia num aumento da densidade óptica da cultura.

Em seguida aumentou-se a OD a que se procedia à exposição ao ar para 0,7-0,8. Contudo, o efeito observado anteriormente repetia-se, ou seja, ocorria lise celular. No entanto, crescimentos em placa mostraram que pelo menos alguma fracção da células se mantinha viável após a exposição ao oxigénio.

Em seguida testou-se uma metodologia diferente, que consistia em crescer a estirpe até à OD₆₀₀=0,7-0,8, retirar 5 ml de cultura que eram introduzidos num frasco de 50mL aberto e agitado(50rpm) (Figura 12). Foram realizadas no mínimo 3 réplicas de cada ensaio.

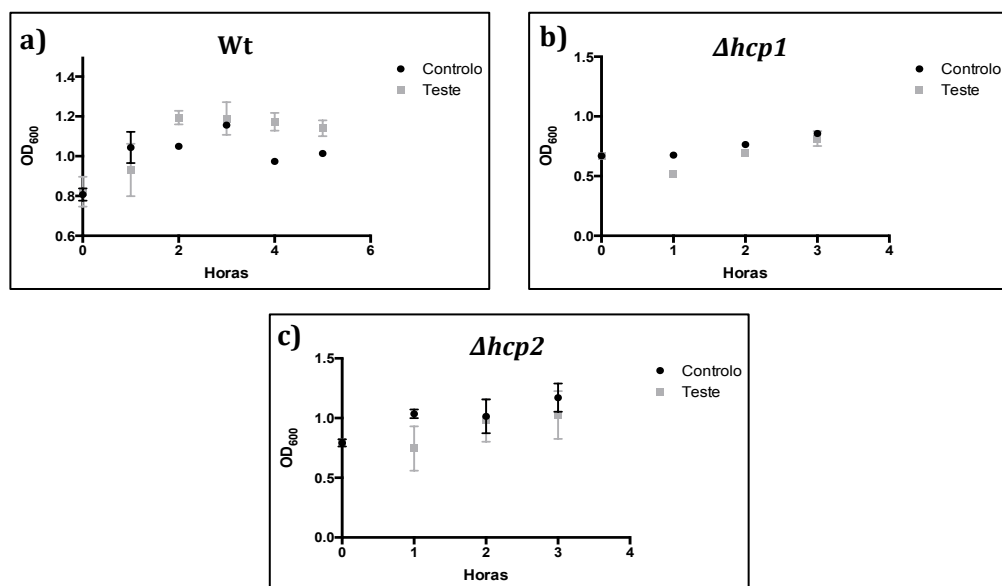


Figura 12 – Crescimentos do Wt e de mutantes de *D. vulgaris* Hildenborough expostos ao oxigénio. Controlo- não exposto ao O₂; Teste – Exposto ao O₂. a) *Wilde-type*, b) Mutante $\Delta hcp1$ (Dvu2013). c) Mutante $\Delta hcp2$ (DVU2543).

Embora as culturas não tenham sofrido uma subida drástica de OD, não foi observada diferença na viabilidade entre expostos e não expostos ao oxigénio.

Aplicou-se ainda outra metodologia alternativa, que consistia em crescer a cultura de cada estirpe até à OD₆₀₀=1, momento em que eram retirados 500μL. Estes volumes foram então inóculados em 2 mL de meio não desarejado num erlenmeyer de 100mL. As culturas foram plaqueadas ao tempo e após 15 min de exposição ao ar com agitação (50rpm) (Figura 13). Como podemos observar pela representação gráfica destes plaqueamentos, não foi possível observar qualquer tipo de diferença de viabilidade entre controlo e teste. Foram realizadas 2 réplicas de cada ensaio.

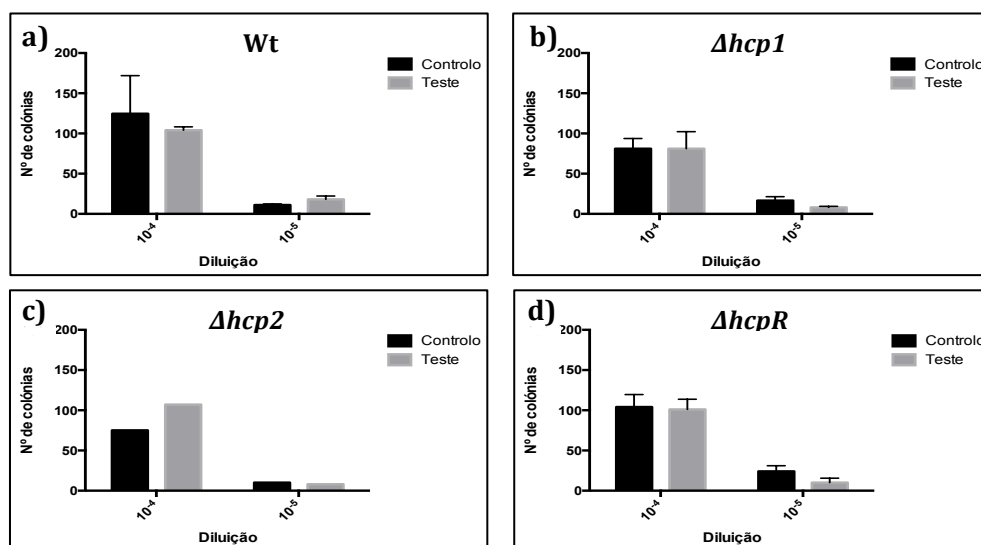


Figura 13 – Representação gráfica da contagem de CFU's realizadas ao Wt e aos mutantes de *D. vulgaris* Hildenborough antes e depois de exposição ao Oxigénio. Controlo- plaqueado ao tempo 0; Teste – plaqueado 15 min após exposição. a) *Wilde-type*, b) Mutante $\Delta hcp1$ (Dvu2013). c) Mutante $\Delta hcp2$ (DVU2543). d) Mutante $\Delta hcpR$ (DVU2547).

Concluimos que os genes *hcp1* e *hcp2* de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough não estão envolvidos na proteção ao oxigénio.

1.3. Efeito do nitrito na viabilidade dos mutantes $\Delta hcp1$, $\Delta hcp2$ e $\Delta hcpR$

Dados bibliográficos descrevem *hcp2* e *hcpR* como sobre-expressos quando *D. vulgaris* Hildenborough é crescido na presença nitrito^{[50][128]}.

A fim de verificar se as estirpes de mutantes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough apresentavam sensibilidade ao nitrito, fomos avaliar o crescimentos de mutantes nestes genes, bem como de mutantes de *hcp1* na presença de nitrito.

Foram usadas as seguintes concentrações de NaNO_2 : 1mM e 2,5mM^{[50][51][52]} (Figura 14 e 15). Foram efetuadas no mínimo 3 réplicas para cada ensaio quando se testou 1mM de nitrito e apenas 1 réplica quando se testou 2.5mM de nitrito.

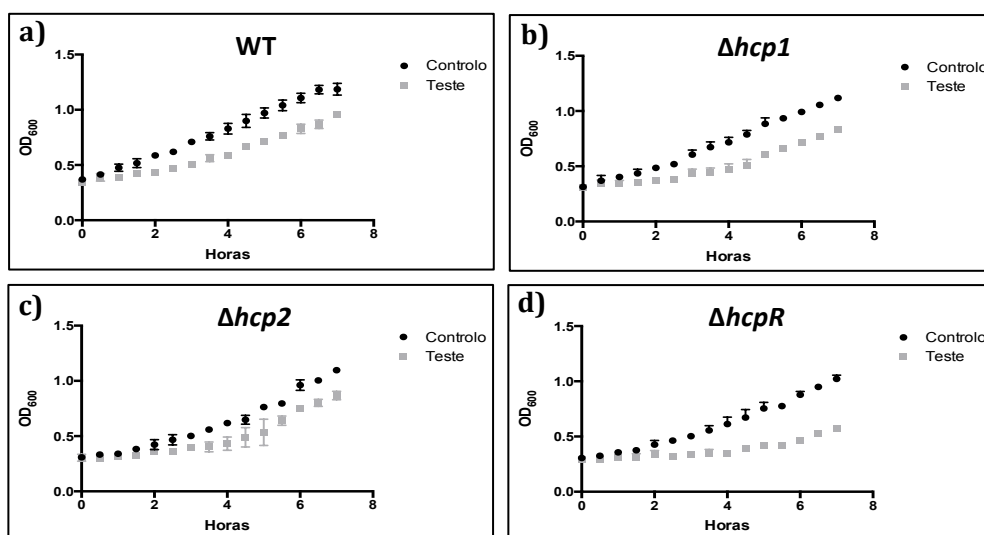


Figura 14 – Crescimentos de mutantes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough sob stress de 1mM de NaNO_2 . Controlo- sem adição de NaNO_2 ; Teste - NaNO_2 1mM a) *Wilde-type*. b) Mutante $\Delta hcp1$ (Dvu2013). c) Mutante $\Delta hcp2$ (DVU2543). d) Mutante $\Delta hcpR$ (DVU2547).

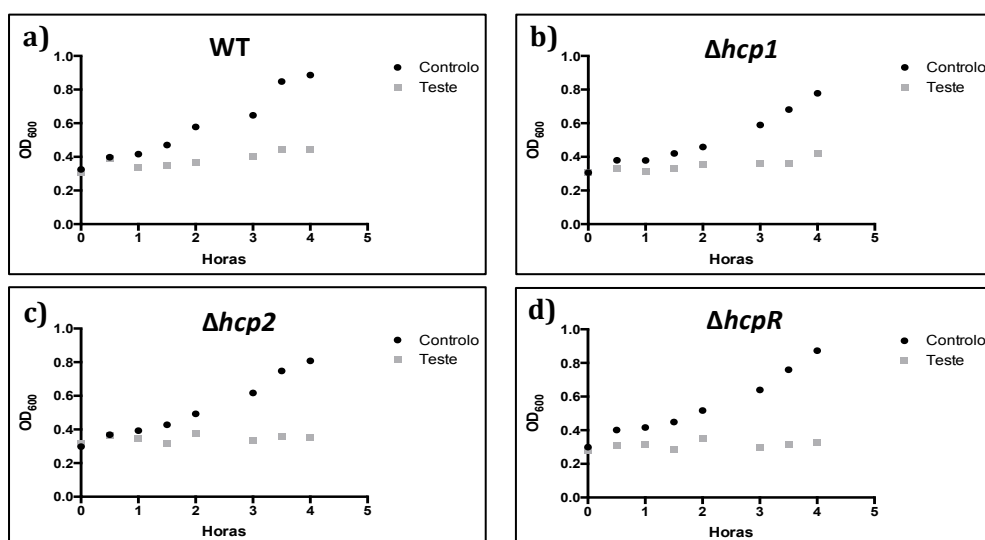


Figura 15 – Crescimentos de mutantes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough sob stress de 2,5mM de NaNO₂. Controlo- sem adição de NaNO₂; Teste - NaNO₂ 1mM a) *Wilde-type*. b) Mutante $\Delta hcp1$ (Dvu2013). c) Mutante $\Delta hcp2$ (DVU2543). d) Mutante $\Delta hcpR$ (DVU2547).

Com 1mM de NaNO₂, observa-se que não ocorre uma redução significativa da viabilidade celular nas estirpes mutantes $\Delta hcp1$ e $\Delta hcp2$, sendo o seu efeito semelhante ao induzido no Wt. Observa-se, contudo, um ligeiro atraso no arranque da cultura do mutante $\Delta hcp1$ exposto a 1mM de NaNO₂, quando comparado com o seu crescimento em condições controlo. Nas mesmas condições, o efeito do nitrito na viabilidade do mutante $\Delta hcpR$ é óbvia, o que sugere o possível papel deste regulador na resposta a este tipo de stress. No entanto, como o seu regulão não é totalmente conhecido, o estudo deste mutante não foi prosseguido.

Quando se aplicou 2,5mM de NaNO₂ (Figura 15), o Wt, bem como todos os mutantes apresentam igual comportamento: o seu crescimento encontra-se muito comprometido. Pelo contrário, quando *D. vulgaris* Hildenborough foi crescido com uma concentração de 1mM de NaNO₂ (Figura 14), não se verifica diminuição drástica da viabilidade celular.

Visto o crescimento de todas as estirpes, inclusive o do Wt, ter sido gravemente comprometido pela presença de 2,5mM de NaNO₂, não é possível verificar qualquer efeito diferencial nas viabilidades apresentas nestas condições.

Conclui-se assim que não se observam diferenças significativas na viabilidade entre o Wt e os mutantes, pelo que as Hcp's não estão envolvidas na resposta a este tipo de stress.

2. Contribuição dos genes *hcp1*, *hcp2*, *roo1* e *roo2* na defesa contra o stress causado pelo óxido nítrico.

Visto estar descrito na literatura a sobre-expressão do gene *hcpR* e *hcp2* quando *D. vulgaris* Hildenborough cresce na presença de nitrito ou nitrato^[52], é possível que os produtos destes genes estejam de alguma forma também envolvidos na resposta ao stress por óxidos nitrogenados. Esta ideia é também apoiada pela descrição de atividade de hidroxilamina redutase por parte desta classe de proteínas (Hcp's)^[114]. Assim, avaliou-se se as duas Hcp's poderiam estar também envolvidas na resposta ao stress induzido por óxido nítrico. Em paralelo, averiguou-se também o papel de outros dois genes, a *roo1* e *roo2*, uma vez que proteínas semelhantes às codificadas pelos genes referidos foram, em outros organismos, incluindo em diferentes estirpes de *Desulfovibrio*, implicadas na resposta e mesmo destoxificação de NO^[97]. Outra razão para a avaliação destes genes é o facto de o gene *roo1*(*Dvu2014*) se encontrar imediatamente a jusante do gene *hcp1*(*Dvu2013*). Embora não pertençam ao mesmo operão, estes genes encontra-se na mesma ilha genómica, pelo que em trabalhos anteriores não foi possível avaliar as funções separadamente.

2.1. Ensaios de Complementação em *E.coli* K-12 LMS2710 com genes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*hcp1*, *hcp2*, *roo1*)

De forma a avaliar um possível papel dos produtos codificados pelos genes *hcp1*, *hcp2*, *roo1* e *roo2* na proteção contra o NO, procedemos a ensaios de complementação, em *E.coli* K-12 mutada em *norV*, que tem uma sensibilidade acrescida ao NO uma vez que este gene que codifica a FIRd de *E.coli*, uma flavorubredoxina caracterizada como reduzindo NO. Para tal transformou-se a estirpe mutada com vectores em que estão clonados com os genes cuja influência na resposta a este tipo de stress se quer determinar. Embora o objectivo fosse a avaliação do papel dos 4 genes atrás referidos, até ao término do presente trabalho, não foi possível proceder à clonagem do gene *roo2*, de forma que os resultados apresentados referem-se apenas ao trabalho realizado recorrendo aos genes *hcp1*, *hcp2*, *roo1*.

O primeiro passo neste processo foi amplificação dos genes em causa (*hcp1*, *hcp2* e *roo1*) efetuando um PCR a partir do DNA genómico. O tamanho esperado para cada um dos amplificadores é: *hcp1* – 1941bp; *hcp2* – 1908bp; *roo1* – 1562bp (Figura 16-a). Como pode ser observado, as amplificações dos genes referidos foram realizadas com sucesso, obtendo-se os produtos do tamanho esperado. Estes, bem como o vector a usar (pUC18), foram digeridos com as enzimas selecionadas para clonagem (SmaI e PstI), sendo em seguida ligados com T4 DNA ligase. As ligações foram transformadas em *E.coli* XL1 Blue. Após seleção dos transformantes através de PCR de colónias, os clones positivos foram

submetidos a digestão com as enzimas de restrição de clonagem afim de confirmar a clonagem correta (Figura 16-b e 16-c).

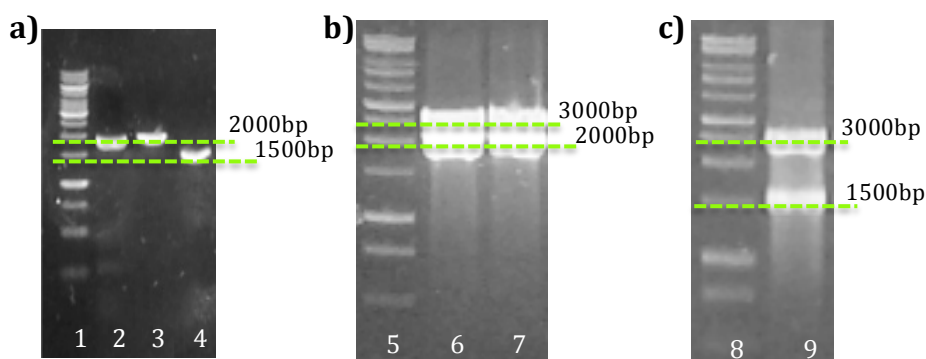


Figura 16 - Electroforese em gel de agarose (1%) a) dos produtos de amplificação da ORF dos genes *hcp1* (Dvu2013), *hcp2* (Dvu2543) e *roo1* (Dvu2014) de *D. vulgaris* Hildenborough, b) dos produtos de digestão de pUC18*hcp1* (Dvu2013), pUC18*hcp2* (Dvu2543) e c) pUC18*roo1* (Dvu2014) com as enzimas de restrição KpnI e PstI. Poço 1, 5 e 8) marcador molecular 1Kb, 2) *hcp2*, 3) *hcp1* e 4) *roo1*, 6) pUC18*hcp1*, 7) pUC18*hcp2*, 9) pUC18*roo1*.

Verificamos que as bandas originadas são compatíveis com o tamanho dos inserts. Estes clones foram então sequenciados e as suas sequenciações alinhadas com a sequência teórica anotada.

Após obtidos os 3 vectores recombinantes, contendo cada um deles uma inserção correta do respectivo fragmento, estes foram usados para transformar células *E.coli* K-12 LMS2710 ($\Delta norV$) tornadas competentes pelo método do cloreto de cálcio. Estas células foram então utilizadas para realizar ensaios de complementação, usando uma concentração de 100 μ M de Spermina Nonoato, um dador de NO (Figura 17). Nestes ensaios usou-se como controlo o mesmo tipo de células mas contendo o vector vazio (sem qualquer tipo de fragmento clonado). Cada ensaio tem, no mínimo 4 réplicas independentes.

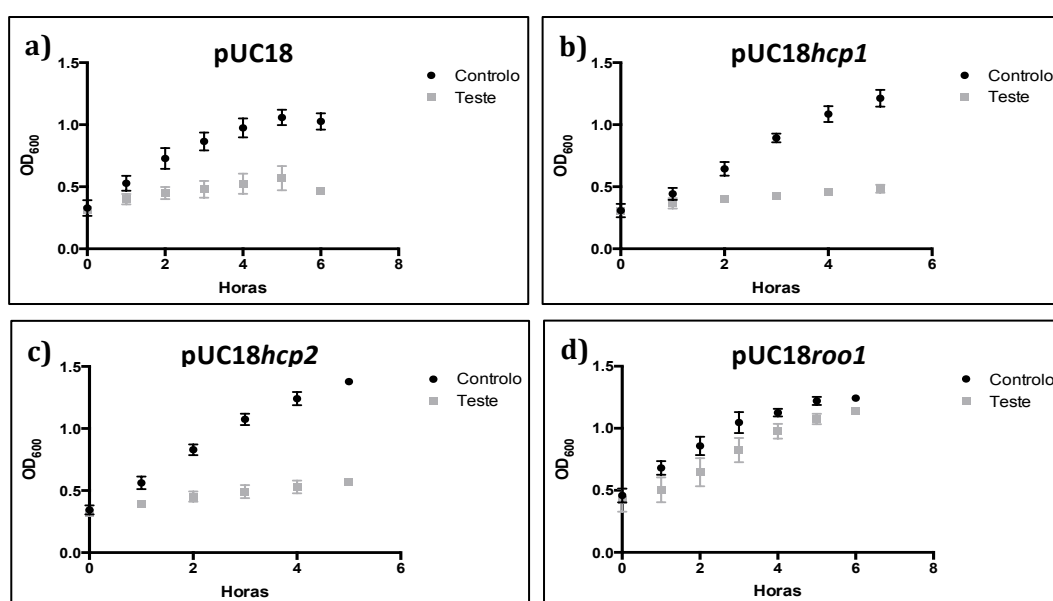


Figura 17 - Crescimentos anaeróbios de *E.coli* K-12 LMS transformada com a) pUC18, b) pUC18*hcp1*, c) pUC18*hcp2* e c) pUC18*roo1*. Em todos os crescimentos estão representados as réplicas em que foi induzido stress (Teste) e aquelas que não sofreram qualquer tipo de stress (Controlo). O stress foi induzido quando a estirpe atingiu uma OD₆₀₀=0,3 pela adição de Spermina Nonoato numa concentração de 0,3.

Verificamos que as únicas células, que na presença de stress, apresentam semelhante viabilidade na presença e na ausência de NO são as transformadas com pUC18*roo1*, ou seja, expressando a Roo1. Isto significa que o produto da ORF clonada neste vector, protege contra o óxido nítrico, colmatando assim a deficiência apresentada pelo mutante.

Para as células transformadas com pUC18*hcp1* e pUC18*hcp2* não se observou em relação ao controlo um aumento da resistência, e portanto da viabilidade, perante uma exposição com NO em relação ao controlo. Apesar de não ter sido observada uma complementação da mutação nas células transformadas com pUC18*hcp2* e com pUC18*hcp1*, na ausência de stress nitrosativo estes genes parecem conferir algum tipo de vantagem, uma vez que comparando OD₆₀₀ máxima atingida pela estirpe complementada como vector vazio (aproximadamente 1,1 unidades ópticas) e a OD₆₀₀ máxima atingida pela estirpe complementada com os diferentes vectores (aproximadamente 1,5 unidades ópticas) observamos uma diferença substancial sugerindo um aumento da viabilidade celular quando os referidos genes estão presentes.

Concluímos assim que, perante os dados obtidos, *hcp1* e *hcp2* não estão envolvidos na defesa ao stress NO. Contudo, o gene *roo1*, complementa a mutação da estirpe LMS2710, indicando que o seu produto esta de facto envolvido na destoxificação de NO.

Visto ter não ter sido possível no tempo útil permitido para a realização do corrente trabalho, a clonagem do gene *roo2* afim de proceder a ensaios de complementação e portanto assim avaliar a sua importância perante stress nitrosativo, procedeu-se à avaliação da viabilidade do organismo *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough mutado neste gene, quando exposto a este tipo de stress. O mesmo foi efectuado para o mutante de *D. vulgaris* Hildenborough no gene *roo1*.

2.2. Efeito do óxido nítrico na viabilidade dos mutantes $\Delta roo1$ e $\Delta roo2$

As rubredoxinas oxigénio:oxirredutases (*roo*'s) foram descritas anteriormente como conferindo protecção contra o stress nitrosativo. *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough possui dois genes, a *roo1* (DVU2014), sendo o gene imediatamente a jusante do gene *hcp1* (Dvu2013) e *roo2* (Dvu3185). Para determinar se estes genes de *D. vulgaris* Hildenborough têm função semelhante, estudou-se o comportamento do Wt e de mutantes nos dois genes em questão quando submetidos a stress com NO. Caso os genes deletados estejam envolvidos na resposta ao tipo de stress aplicado, deverá ser observado uma diminuição da sua capacidade de sobrevivência quando comparada com a do Wt nas mesmas condições. Como agente indutor de stress usou-se o dador de NO, DPTA Nonoato numa concentração de 100µM (Figura 18). Foram realizadas, no mínimo, 3 réplicas de cada um dos ensaios.

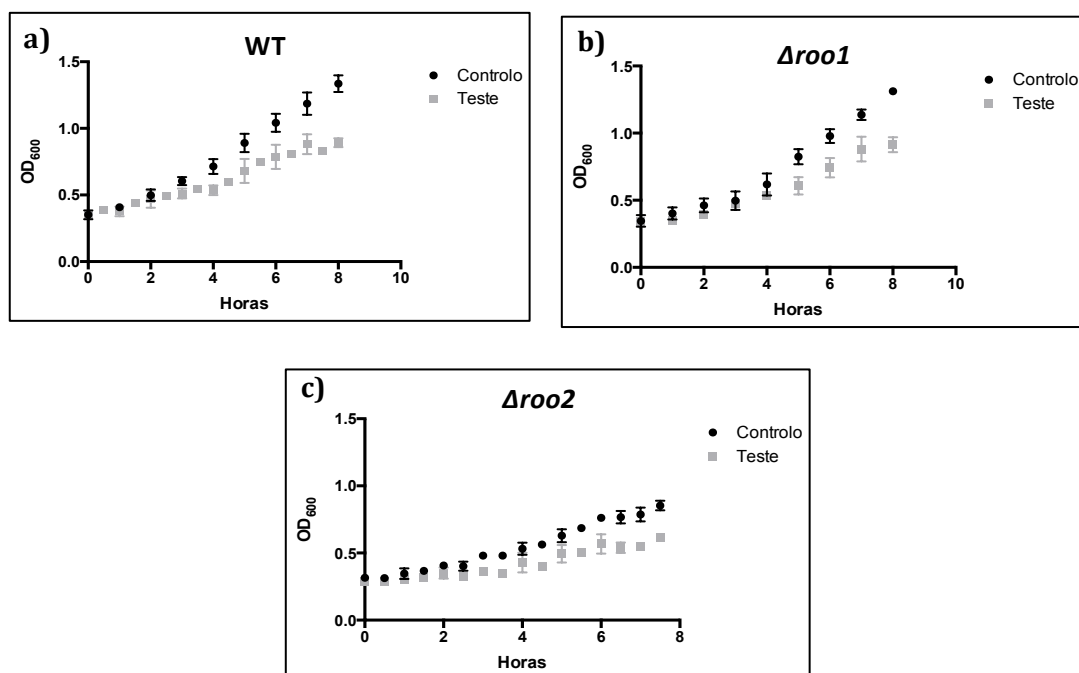


Figura 18 – Crescimentos de mutantes de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough sob stress com 100μM DPTA Nonoato. Controlo- sem adição de DPTA; Teste – DPTA 100μM. a) *Wilde-type*. b) Mutante *Δroo1* (*Dvu2014*). c) Mutante *Δroo2*(*DVU3185*).

O agente dador de NO usado neste tipo de ensaio é diferente do aplicado nos ensaios de complementação (secção IV-1.2) visto tratar-se de células de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, que apresentam uma velocidade de crescimento bastante inferior à de *E.coli*. Assim, é necessário usar-se um dador cujo tempo de meia-vida seja superior, sendo portanto mais estável, (Spermina Nonoato - $t_{1/2}$ =230min) em ensaios com estirpes de metabolismo rápido (como *E.coli*). Pelo contrário, em ensaios com estirpes de crescimento lento como *Desulfovibrio*, tal não é necessário pois a sua recuperação é mais lenta (DPTA Nonoato – $t_{1/2}$ =180min).

A viabilidade do mutante *Δroo1* não se encontra significativamente afectada quando comparada com a viabilidade do Wt o que mostra que o gene não confere proteção contra este tipo de stress, ao contrário do que foi observado por ensaio de complementação.

Uma razão possível para a não observação de fenótipo será a existência de outras proteínas que em *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough tenham a mesma função que Roo1.

O mesmo se observa para a estirpe mutada para *roo2*, ou seja, não apresenta qualquer fenótipo para o NO. Contudo verificamos que nesta estirpe a velocidade de crescimento é inferior tanto ao Wt como ao mutante *Δroo1*. Isto significa que este mutante apresenta algum tipo de sensibilidade intrínseca, de modo que a baixa velocidade de duplicação desta estirpe mutante dificulta uma comparação direta com o Wt.

3. HcpR

Um dos principais objectivos deste trabalho é avaliar a importância dos genes *hcp1* e *hcp2* de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, que codificam duas *hybrid cluster proteins*, na resposta a stress. Estes dois genes apresentam uma elevada homologia, tanto ao nível da identidade e similaridade proteica como do DNA que as codifica (identidade- 47%, similaridade – 52%). Encontra-se já descrito um regulador para o gene *hcp2*, a HcpR tendo sido identificada uma pontual sequência consenso onde a HcpR se liga. Este regulador, pertencente à família de reguladores CRP/FNR ^{[95][96]}. Foi também descrita a *downregulation* do gene *hcp2* na estirpe mutante $\Delta hcpR$. Nunca foi contudo demonstrada uma interação direta entre HcpR e DNA de qualquer tipo. A avaliação desta possível interação, apresenta-se então como de extremo interesse. Devido à grande homologia entre o gene *hcp2* e o gene *hcp1*, bem como a sua preponderância no presente trabalho, a avaliação da potencial interação da HcpR zona promotora de *hcp1* foi também estudada.

3.1. Clonagem, Expressão e Purificação – pET28ahcpR

De forma a avaliar a possível interação direta entre as zonas promotoras deste genes e o regulador HcpR, optou-se pela realização de ensaios de Electrophoretic Mobility Shift Assay,. Para a realização deste tipo de técnica, duas coisas são necessárias: o regulador, isolado com a sua conformação nativa e os fragmentos de DNA com que a HcpR poderá interagir.

O primeiro passo foi a obtenção da proteína recombinante HcpR. Para tal amplificou-se a ORF do gene que codifica o regulador HcpR (Figura 19-a). Verifica-se que a banda resultante é compatível com a zona que se pretendia amplificar (791bp).

Em seguida este fragmento foi digerido, bem como o plasmídeo de expressão selecionado para clonagem (pET28a), com as enzimas de clonagem (NdeI e EcoRI). Realizou-se a ligação do plasmídeo e do insert digeridos com T4 DNA ligase e estas reações forma transformada em células *E.coli* XL1 Blue.

O vector de expressão selecionado, o pET28a⁺, para além de expressar de forma eficaz, mediante indução com IPTG, qualquer sequência de DNA nele inserida, insere também em todos os seus produto de expressão uma His-tag N-terminal. Esta tag permite uma purificação mais simples e mais eficaz da proteína em estudo.

As enzimas NdeI e EcoRI foram selecionadas para clonagem com base em locais de corte existentes no MCS do vector em questão e locais de corte ausentes na sequência de interesse. Estas foram também selecionadas por permitirem

uma digestão simultânea, uma vez que ambas as enzimas apresentam compatibilidade de tampões e a mesma temperatura óptica de atuação. Outra grande vantagem da clonagem com a enzima de restrição NdeI é o facto de o local de corte reconhecido por esta enzima apresentar um codão de iniciação (CAT[↓]ATG) que se encontra em *frame* com o promotor de T7 existente neste plasmídeo e a partir do qual a transcrição é efectuada. Assim, se garantirmos que o primer *forward* contém este local de corte e que o codão de iniciação nele existente coincide com o codão de iniciação da nossa proteína de interesse, garantimos também que a clonagem é realizada em *frame*, ou seja, a grelha de leitura a ser lida é a correta e que, portanto, o produto obtido será o correto. Isto contribuiu para a correta clonagem que observamos (Figura 24) e que foi confirmada por sequenciação.

Após seleção dos transformantes através da técnica de PCR de colónias, efetuou-se a digestão dos possíveis clones positivos com as enzimas de clonagem (Figura 19-b). Podemos verificar que surgem então as bandas correspondentes ao plasmídeo (pET28a) linearizado (5.369bp) e uma banda que apresenta a mobilidade apresentada pelo insert (aproximadamente 800bp).

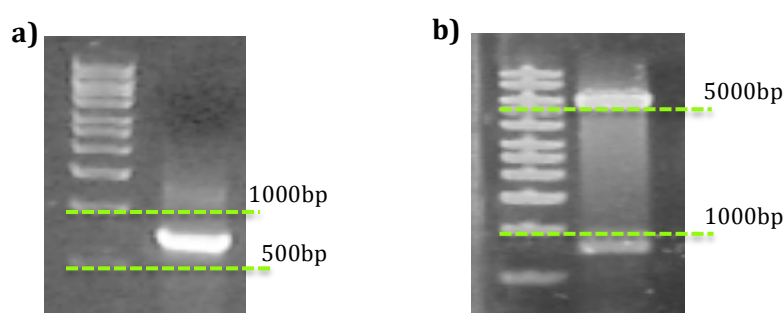


Figura 19 - Electroforese em gel de agarose (1%) a) da amplificação da ORF que codifica o gene *hcpR* (*Dvu2547*). Poço 1) marcador molecular 1Kb e 2) *hcpR* amplificado (797bp); b) da reação de digestão do pET28*hcpR* com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI (cortes de clonagem). Poço 1) marcador molecular 1Kb e 2) pET28*hcpR* digerido

Os clones que apresentam uma banda consistente com o insert inserido foram sequenciados. A sequenciação obtida foi alinhada com a sequência prevista para o gene. Verificou-se que a OFR do gene *hcpR* tinha sido inserida com sucesso no vector e a sua sequência estava de acordo com o anotado.

Tendo já o gene corretamente clonado, o passo seguinte foi a expressão da proteína de interesse. Para tal foi necessário escolher as células de expressão mais adequadas bem como as condições que permitissem uma sobre-expressão.

Foram testadas 3 estirpes de células de expressão : *E.coli* BL21 (DE3) Gold, *E.coli*, BL21 pLysS Star e *E.coli* JM109 (DE3) e duas condições de expressão (Quadro 20).

Ao fim do tempo de incubação determinado para cada uma das condições, recolheu-se a fracção celular de cada crescimento e aplicou-se uma amostra em gel de SDS-page a fim de verificar se a proteína de interesse estava a ser expressa e em qual das condições e tipo de células a proteína mais eficazmente produzida (Figura 20).

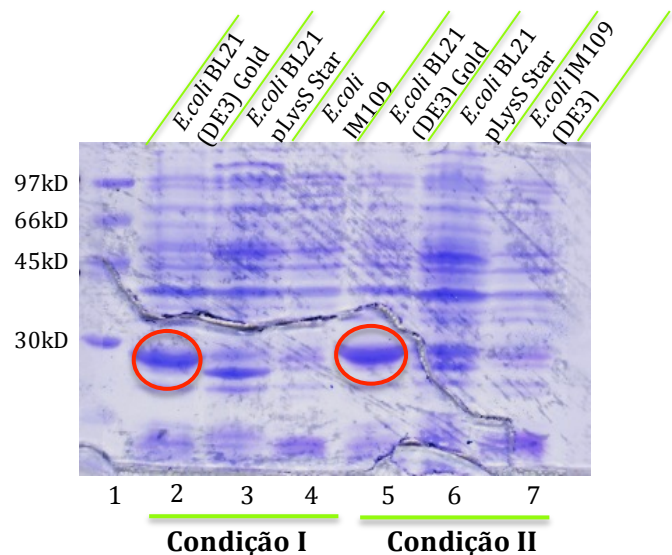
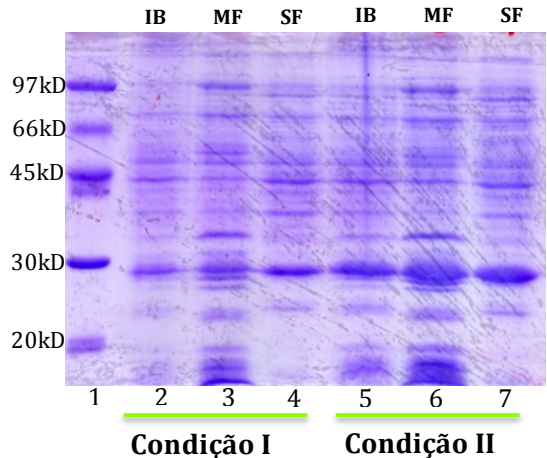


Figura 20 - Electroforese em gel SDS-page (12%) da fracção solúvel de crescimentos efectuados para teste de condições de expressão. Poço 2-4) condição I, 5-7) condição II. Poço 1) marcador molecular de baixo peso molecular, 2 e 5) *E. coli* BL21 (DE3) Gold, 3 e 6) *E. coli* BL21 pLysS Star, 4 e 7) *E. coli* JM109 (DE3).

Verificamos que a proteína de interesse (27kD) está a ser sobre-expressa, e que esta sobre-expressão é maior nas células *E. coli* BL21 (DE3) Gold (Figura 20).

Procedeu-se, em seguida ao isolamento da fracção solúvel referente a cada um dos crescimentos de *E. coli* BL21 (DE3) Gold. Aplicou-se em gel amostras com a mesma quantidade celular aproximada de cada uma das fracções: Corpos de inclusão – IB; Fracção Membranar – MF, Fracção Solúvel – SF (figura 21).



Quadro 20 - Condições de indução de expressão testadas para a sobre-expressão da HcpR a partir de pET28a

Condição I	Condição II
OD ₆₀₀ (indução)=0,3	OD ₆₀₀ (indução)=0,5
[IPTG] =400µM	[IPTG] =200µM
37°C	20°C
4h	Overnight

Figura 21 - Electroforese em gel de SDS-page (12%) das amostras obtidas a partir de cada fracção isolada durante o processo de obtenção da fracção solúvel. Poço 1) marcador molecular de baixo peso molecular, 2-4) fracções referentes ao crescimento em que se aplicou a condição I, 5-7) fracções referentes ao crescimento em que se aplicou a condição II. Poço 2 e 5) Corpos de inclusão – IB, 3 a 6) Fracção Membranar – MF e 4 a 7) Fracção Solúvel – SF.

Verificamos que a sobre-expressão é superior nos crescimentos efetuados com a condição II.

Após optimização das condições (Quadro 21 e Figura 22), procedeu-se a crescimentos em volumes superiores (5L) e ao isolamento da fração solúvel correspondente (Figura 22)

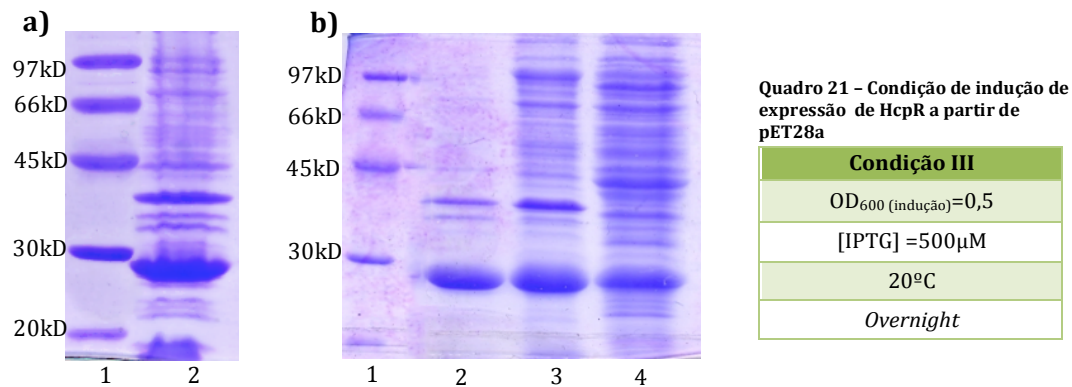


Figura 22 - Electroforese em gel de SDS-page (12%) de a) uma amostra da fracção celular resultante do crescimento de indução de expressão de *E.coli* BL21 (DE3) Gold transformada com pET28ahcpR sob a condição III. Poço 1) amostra de fracção celular, 2) marcador molecular de baixo peso molecular

O passo seguinte foi a purificação da proteína, usando uma coluna *Chelating Sepharose Fast Flow*. As várias eluições foram corridas em gel afim de verificar a localização da proteína de interesse (Figura 23-a). As eluições onde a proteína se encontrava foram concentradas (Figura 23-b), quantificadas e aliqotada para ensaios futuros.

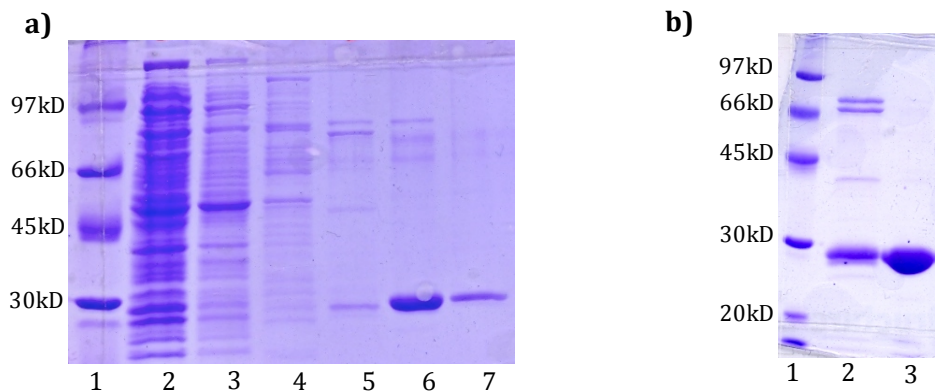


Figura 23 - Electroforese em gel de acrilamida (12%) a) de cada uma das fracções eluidas da coluna *Chelating Sepharose Fast Flow* durante o processo de purificação a fim de localizar a proteína de interesse. Poço 1) Marcado molecular de SDS de baixo peso molecular, 2) aplicação da amostra, 3) *Binding Buffer*, 4) *Wash I*, 5) *Wash II*, 6) *Wash III* e 7) *Elute*. b) das fracções submetidas a concentração bem como o *flow-through* resultante das suas concentrações. Poço 1) Marcado molecular de SDS de baixo peso molecular, 2) concentração *WashII+Elute*, 3) concentração *WashIII*.

Como podemos avaliar pelos resultados obtidos, temos uma expressão efetiva e eficaz da proteína de interesse.

Em todos os ensaios de expressão verificamos a sobre-expressão da proteína de interesse, que apresenta uma massa molecular de 27kD. Contudo, o regulador

apresenta apenas 25kD. Este incremento de massa molecular explica-se pela introdução da cauda de histidinas que se encontra entre 19 aminoácidos (MGSSHHHHHSSGLVPRGS). Isto resulta na adição de 2.2kD à massa molecular da proteína sobre-expressa.

Aquando do isolamento da fração solúvel, verificou-se que a proteína está localizada em todas as fracções isoladas, incluindo uma quantidade considerável também na fase solúvel. Esta fragmentação da *pool* proteica, principalmente em crescimentos de grande volume e longo período de incubação, resulta numa elevada concentração de massa celular podendo ocorrer corpos de inclusão.

O processo de optimização referido, visou a maximização do rendimento de expressão obtido, tentando assim garantir que a proteína presente na fração solúvel fosse significativa. Com este processo, obteve-se quantidades proteicas finais entre 0,6e 1.3 mg/L de meio de cultura. Esta proteína será usada em ensaios de EMSA a realizar em seguida.

É de referir que todo o processo de purificação e de manipulação de proteína foi efectuado em anaerobiose. Isto justifica-se pelo facto de este regulador, bem como os genes acerca dos quais queremos verificar o efeito, pertencerem a um organismo anaeróbio, e portanto, ser possível que a presença de oxigénio possa induzir algum tipo de alterações proteicas conformacionais ou oxidativas que possam destabiliza-la, impedindo o normal desempenho e função (observados *in vivo*). É portanto necessário garantir que as condições aplicadas mimetizam ao máximo as condições naturais.

Idealmente, toda a *pool* proteica seria eluída numa única fracção. Contudo, tal nem sempre acontece. Como podemos verificar no gel de SDS não existem quantidades significativas da proteína sobre-expressa nas 2 primeiras fracções eluídas (poço 1 - Aplicação da amostra; poço 2 – Aplicação do *Binding Buffer*) o que mostra que a proteína ficou de facto ligada à coluna, sendo apenas eluídas as restantes proteínas cujo teor de histidinas ou a sua acessibilidade é insuficiente para que haja uma ligação efetiva à matriz. Perante a aplicação do primeiro tampão de eluição contendo imidazole, verifica-se a eluição de proteínas que apresentavam alguma afinidade para a matriz (poço 3 – *Wash I*). Com o sucessivo aumento de competidor, a proteína de interesse vai sendo eluída da coluna, apresentando-se distribuída por 3 eluições, estando contudo a sua maioria localizada numa única pool (referente à eluição com o tampão de eluição *WashIII*); A *pool* com maior quantidade de proteína foi concentrada, bem como as duas restantes, que foram juntas e concentradas em conjunto.

É de referir, que após concentração da amostra a troca de tampão foi efectuada de imediato de forma a garantir a estabilidade e integridade da

proteína isolada. Esta rapidez na troca de tampão mostrou-se essencial uma vez que quando se tentou efetuar-se a troca de tampão através de diálise *overnight*, ocorreu precipitação de grande parte da proteína purificada. Assim, optou-se por uma troca de tampão imediata, recorrendo a uma coluna de exclusão molecular PD10 (tampão proteico - Tris-HCl pH 7,6, NaCl 500mM).

Obtivemos assim a proteína de interesse, o regulador HcpR, numa forma pura (Figura 24) e em concentrações adequadas à sua aplicação em estudos posteriores.

3.2. *Binding* do regulador HcpR às zonas promotoras dos genes *hcp1*, *hcp2*, *fld*, *feoA* e *ahpC*

A fim de avaliar a possível interação do regulador HcpR com as zonas reguladoras dos genes de interesse, fomos realizar ensaios de EMSA usando como sondas as zonas promotoras dos genes cuja interação direta com o regulador queremos averiguar e como proteína de afinidade ao DNA a HcpR previamente isolada e purificada (secção IV-3.1) .

Em primeiro lugar seleccionaram-se as zonas promotoras a usar nos ensaios subsequentes. As zonas promotoras dos genes *hcp1* e *hcp2* foram seleccionados pelas razões acima apresentadas. Visto os genes *fld*, *feoA* e *ahpC* serem, a par com *hcp2*, os genes cuja expressão era relatada como sendo mais significativamente alterada quando o gene *hcpR* se encontra mutado^[128], as suas zonas promotoras foram também usadas em ensaios de EMSA.

O primeiro passo neste processo foi a clonagem, a expressão e a purificação do regulador em causa. Este processo foi efectuado como atrás referido (secção IV-3.1).

O passo seguinte foi a amplificação das zonas promotoras dos genes que se pensa estarem sob o controlo deste regulador. Foi também amplificada a região promotora do gene *ftn* (não regulado pela HcpR) afim de servir de controlo (Figura 24).

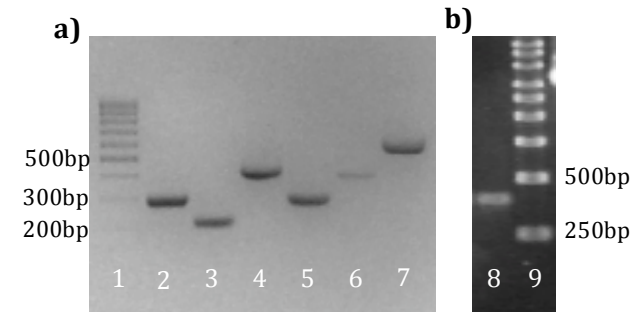


Figura 24 - Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação das zonas promotoras dos genes a) *hcp1*, *hcp2*, *fld*, *feoA*, *ahpC* e b) *ftn*. Poço 1) marcador molecular 100bp, 2) *hcp1*, 3) *hcp2*, 4) *fld*, 5) *feoA*, 6) *ahpC* e 7) *hcp2* RPL, 8) zona promotora *ftn*

Quadro 22 - Zonas promotoras amplificadas e seus tamanhos esperados

Zona promotora	Tamanho esperado (bp)
<i>hcp1</i>	305
<i>hcp2</i>	221
<i>feoA</i>	304
<i>fld</i>	433
<i>ahpC</i>	402
<i>hcp2</i> RPL	624
<i>ftn</i>	396

Como podemos verificar, os amplificadores estão de acordo com o esperado.

Inicialmente procedeu-se a ensaios de EMSA em géis de agarose a fim de avaliar o possível *binding* por parte da *hcpR* às zonas promotoras seleccionadas.

Foi usada uma razão DNA/proteína de 1:400 e foram testados 2 tampões de binding distintos *Binding Buffer 1 (BB1)* e o *Binding Buffer 2 (BB2)* (secção III-7.6) (Figura 25).

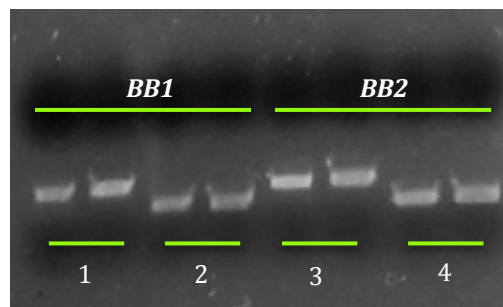


Figura 25- EMSA em gel de agarose (2%) usando as zonas promotoras 1) *hcp1* em BB1) *hcp2* em BB1 3) *hcp1* em BB2 4) *hcp2* em BB2. Cada conjunto é representado por uma reação sem HcpR (controlo) e outra em que o regulador foi adicionado. Razão DNA/proteína 1:400.

Contudo nunca se verificou qualquer *shift* de bandas.

Visto não ter sido observado qualquer tipo de binding, adoptámos outra metodologia. Foram então realizados ensaios de EMSA em gel de acrilamida não desnaturante.

Após marcação dos 3' dos fragmentos DNA com ddUTP-DIG fomos determinar o limite de detecção desta técnica e do aparelho aplicando 0,05pmol, bem como diluições sucessivas (1:10) de cada DNA numa membrana de nylon positivamente carregada onde foi fixado o DNA. Esta membrana foi posteriormente revelada com CSPD (Figura 26).

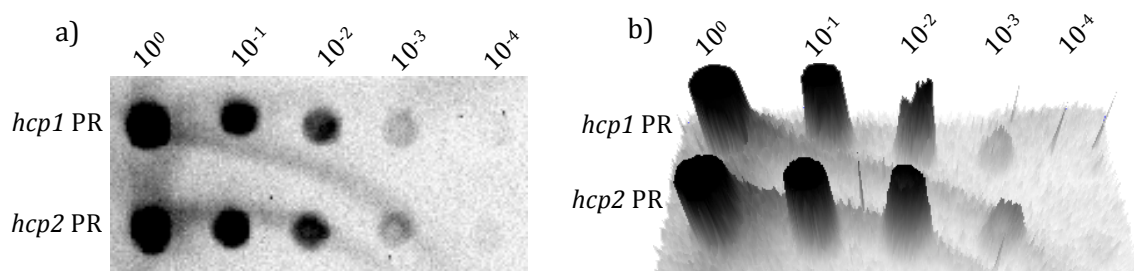


Figura 26 - Imagem de revelação de membrana de teste de limite de detecção das sondas marcadas a serem usadas nos ensaios de EMSA. a) Intensidade de quimioluminescência adquirida em por cada *pool* de sonda durante a aquisição de sinal, diretamente proporcional à quantidade de sonda aplicada b) representação 3D das intensidades apresentadas em a).

Verificou-se assim, que obtemos uma detecção clara para concentrações na ordem dos 50×10^{-4} fmol.

Após a determinação do limite de detecção deste método de aquisição de imagem, procedeu-se aos ensaios de *binding* usando como sonda as zonas promotoras já marcadas.

Aplicando sempre a mesma quantidade de sonda, efetuaram-se ensaios de binding em diferentes condições. Foram testados 3 tampões diferentes, 2 tipos diferentes de géis não desnaturantes (um comercial e outro polimerizado no laboratório (secção III-11.2.3), bem como diferentes percentagens de acrilamida.

Foram efetuadas reações de *binding* (secção III-11.2.2) em que se usou como tampão da reação o tampão *Binding Buffer Kit (BBkit)* (secção III-7.6). Estas reações foram depois corridas em gel não desnaturante comercial 6% (Invitrogen) (Figura 27)

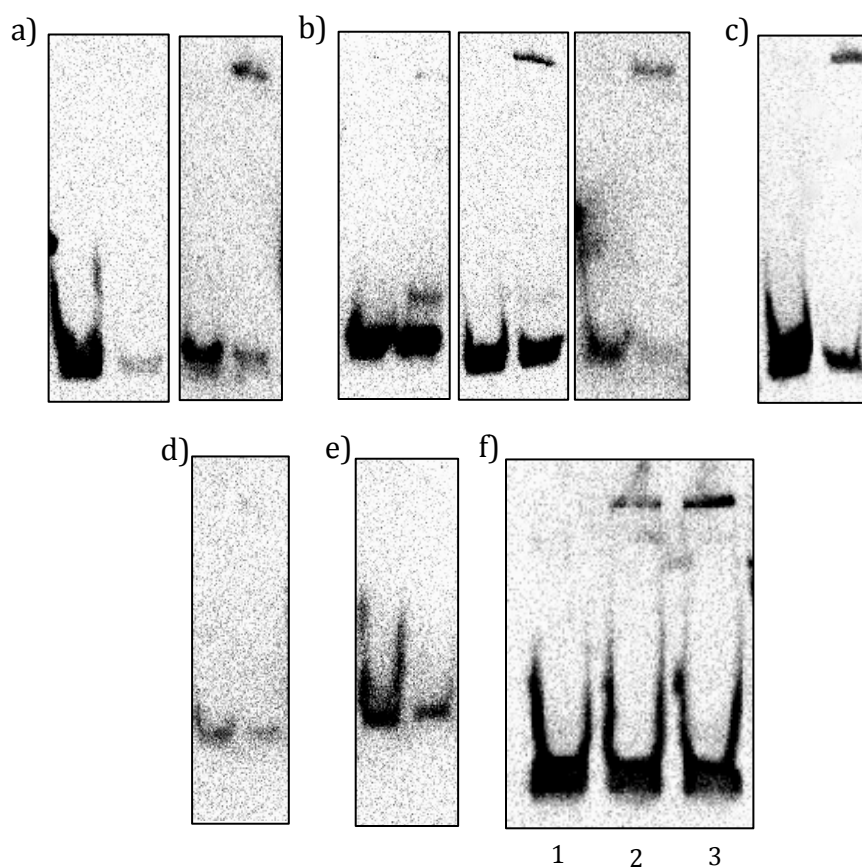


Figura 27 - EMSA em gel não desnaturante pre-casted (6%) usando o *BBkit*. Razão DNA/proteína - 1:4700. a) sonda *hcp1* b) sonda *hcp2*, c) sonda *feoA*, d) sonda *fld* e e) sonda *ahpC*. Cada conjunto é representado por uma reação sem HcpR (controlo) e outra em que o regulador foi adicionado, f) de teste de concentração de proteína com a sonda *hcp2* em *BBKit* corrido em gel não desnaturante pre-casted (6%). Poço 1) reação controlo (sem HcpR), 2) razão sonda/HcpR 1:2000 e c) razão sonda/HcpR 1:4700.

Para uma razão 1:4700 (sonda/proteína) observou-se que quando se usavam as sondas *hcp1*, *hcp2* e *feoA*, aparecia uma banda com posição alterada na reação em que se adicionou proteína (Teste) e consequente diminuição da intensidade da sonda livre. Para as sondas *fld* e *ahpC*, embora ocorra a diminuição da intensidade da sonda livre, não é detetável qualquer banda cuja posição esteja alterada. Foi testado também uma razão mais baixa de sonda proteína (1:2000) usando a sonda *hcp2* na reação de binding e o *BB4*. O comportamento observado foi o mesmo que anteriormente para a razão 1:4700, surgimento de uma banda

com posição alterada com a consequente diminuição de intensidade da sonda livre.

Foram testados géis não desnaturantes polimerizados no laboratório bem como dois novos tampões (*Binding Buffer 3* e *Binding Buffer 4*; secção III-7.6)^[41] (Figura 28)

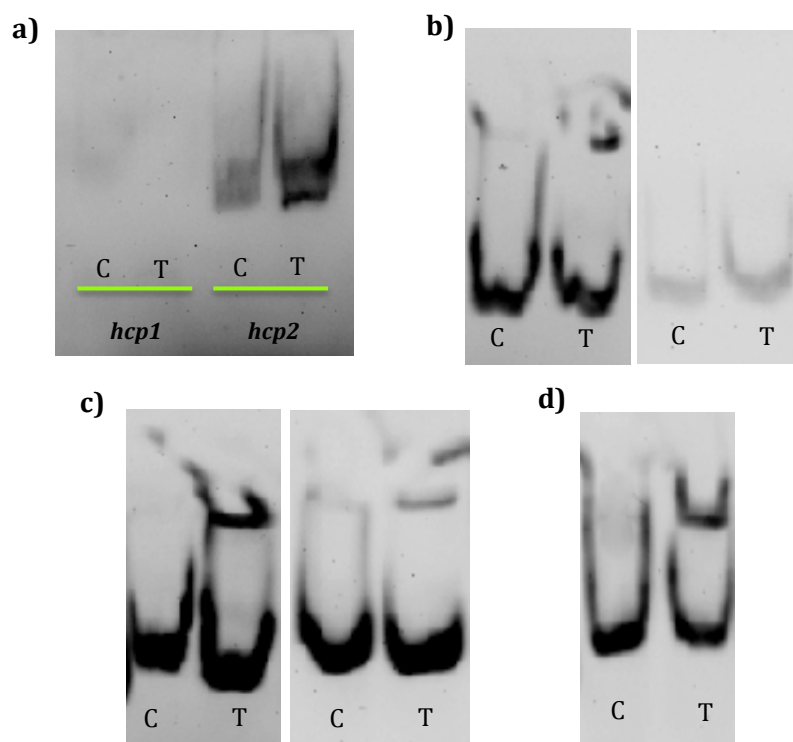


Figura 28 - EMSA usando uma razão sonda/proteína de 1:2000 em gel de acrilamida não desnaturante a) (6%) das sondas *hcp1* e *hcp2* em *BB3*, b) (8%) da sonda *hcp2* em *BB4*, c) (8%) da sonda *hcp1* em *BB4* e d) (8%) da sonda *hcp2* RPL em *BB4*. Cada conjunto é representado por uma reação sem HcpR (controlo) e outra em que o regulador foi adicionado (teste) Cada conjunto é representado por uma reação sem HcpR (controlo) e outra em que o regulador foi adicionado

Verificamos que quando se usou o tampão *BB3* nas reações, não se obteve qualquer tipo de *shift* mas sim uma diminuição da intensidade do sinal. Contudo, quando aplicado o tampão *BB4*, tanto usando as sondas *hcp1* e *hcp2* como para a sonda *hcp2* RPL, observou-se o aparecimento de uma banda com posição alterada.

Para as duas sondas *hcp1* e *hcp2* foram testadas diferentes concentrações de proteína bem como ensaios de competição específica e inespecífica. Usou-se a zona promotora do gene *ftn* como competidor inespecífico. A sonda não marcada foi usada como competidor específico (Figura 29).

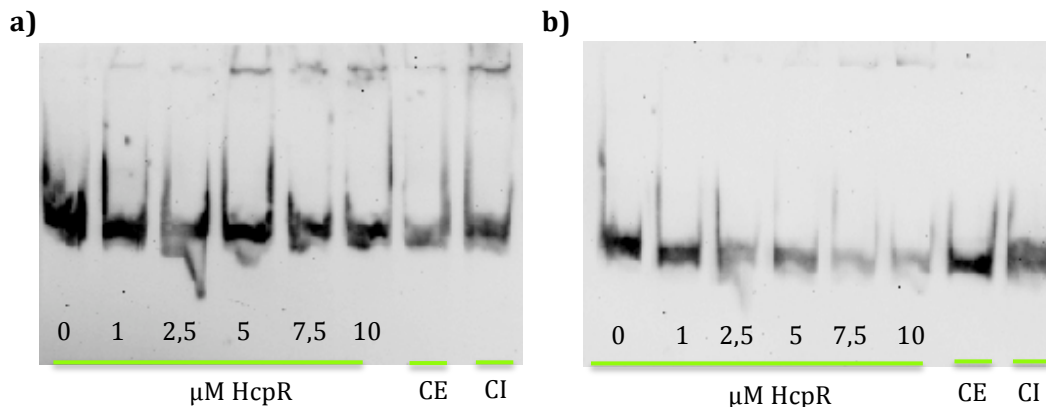


Figura 29 - EMSA em gel de acrilamida não desnaturante (8%) em tampão *BB4*. Teste de competição e de quantidade crescente de proteína. 1) 0, 1, 2.5, 5, 7.5 e 10 μ M HcpR, 2) Competição Específica e 3) competição Inespecífica. a) sonda *hcp1*, b) sonda *hcp2*,

No ensaio em que se usou a *hcp1* como sonda, embora tenham surgido bandas de posição alterada, não ocorreu a diminuição sucessiva da intensidade da sonda livre.

No ensaio em que se usou a *hcp2* como sonda, é possível observar a diminuição da intensidade da sonda livre bem como o aumento da intensidade das bandas de posição alterada com o aumento de proteína. Nos ensaios de competição, embora não se observe as bandas de posição alterada, a intensidade da sonda livre aumenta na competição específica e mantém-se na competição inespecífica, quando comparada com o ensaio em que foi usada a mesma quantidade de proteína - 5 μ M.

Analisando os ensaios efectuados em gel de agarose, torna-se claro que não ocorreu qualquer tipo de binding. Contudo, devido à fraca sensibilidade dos métodos usados na revelação de géis de agarose, foi necessário aplicar em cada reacção no mínimo 50ng de DNA. Isto limitava a quantidade máxima de proteína a usar, pois tal implicaria a adição de um volume de proteína que iria fazer com que o volume de reacção fosse demasiado grande, o que não só impedia a sua aplicação em gel como diluiria de tal forma o meio, que qualquer *binding* seria na realidade dificultado, ao contrário do que se pretendia. Assim, a razão máxima de DNA/proteína que pôde ser aplicada foi de 1:400. A ausência de um *shift* de banda nestas condições por ocorrer por qualquer uma de três razões:

- Estas reacções de binding estarem a ser realizadas em anaerobiose, poderia de alguma forma estar a ocorrer uma ineficiência de ligação deste regulador às suas zonas de reconhecimento devido a qualquer alteração ou competição causada pelo oxigénio.
- A razão DNA/proteína a ser usada não ser suficientemente alta, não sendo portanto a razão sonda/regulador suficientemente alta para que nas condições usadas ocorresse *binding*.
- O método pode não ter sensibilidade suficiente para a detecção do *binding*.

Todas as reações posteriores foram então realizadas em anaerobiose. Aplicou-se também uma nova técnica, EMSA em gel de acrilamida não desnaturante que tem um maior poder de resolução das sondas e que quando associado a uma marcação de DNA (a marcação ddUTP-DIG 3') permite uma detecção mais sensível. A marcação referida permite uma revelação que envolve a detecção de quimioluminescência mediante transferência do DNA para uma membrana e a adição de um reagente quimioluminescente (CSPD). Embora tradicionalmente este tipo de marcação esteja associada a uma detecção de sinal por impressão em placa de raio-X, neste trabalho a detecção foi efectuada pelo aparelho Chemidoc XRS (Biorad) fazendo-se a detecção deste tipo de emissão no comprimento de onda emitido pelo CSPD (477nm).

Determinou-se que através desta nova metodologia se obtinha uma detecção clara da sonda na ordem dos 50×10^{-4} fmol. Este limite de detecção é suficiente para detetar qualquer pequena alteração na mobilidade do DNA marcado (*shift* de banda).

Analisando os resultados destas reações de *binding*, verificou-se que nas reações em que se usaram as sondas *hcp1*, *hcp2* e *feoA* surgiram 2 bandas, ao contrário do que foi observado para a reação controlo (reação em que o regulador não tinha sido adicionado) onde apenas surgia a banda referente à migração normal da sonda na matriz usada (Figura 27, 28 e 29). Uma das bandas apresenta a mesma migração que a banda apresentada na reação controlo, correspondendo assim à fração de sonda que não viu a sua mobilidade afectada. A segunda banda, não possui correspondência na reação controlo e representa a fração de sonda que foi ligada pelo regulador, e que viu assim a sua mobilidade reduzida (fração que apresenta a banda de posição alterada).

No ensaio com a sonda *hcp2*, observa-se a formação da banda de posição alterada bem definida (Figura 27-b). No entanto a migração é diferente mostrando alteração na estabilidade do complexo DNA/proteína. Pode concluir-se que ocorreu de facto a formação do complexo *hcp2*/HcpR e que resultou no retardamento da migração do DNA.

Nos ensaios com as sondas *fld* e *ahpC*, embora ocorra a diminuição da intensidade da banda referente à migração normal da sonda, não surge banda de posição alterada. Tal pode ser devido a uma baixa estabilidade do complexo DNA/proteína.

Foram também realizados ensaios utilizando a sonda *hcp2* em que se variou a quantidade de proteína (5μM e 11.8μM) (Figura 27-f). Neste caso verificou-se o aumento da intensidade da banda de posição alterada e consequente diminuição da intensidade da sonda livre com o aumento da concentração de proteína aplicada.

No segundo ensaio, avaliou-se a variação da concentração de proteína (1μM; 2,5μM, 5μM; 7,5μM; 10μM) e também foram realizados ensaios de competição específica e de competição inespecífica (Figura 29). É de referir contudo, que em todas as reações de *binding* realizadas durante o trabalho, foi sempre adicionado

o polímero sintético poli d(I-C) como competidor para evitar as interações inespecíficas entre DNA/proteína.

Assim, no ensaio de EMSA em que se usou a sonda *hcp2* marcada (Figura 29-b), observa-se um decréscimo sucessivo da intensidade das bandas referentes à fração de sonda marcada que não é ligada pela proteína com o sucessivo aumento da concentração de HcpR aplicada em cada reação. Verifica-se também, o aumento da intensidade da banda de posição alterada. Esta relação direta entre aumento da concentração proteica aplicada e o aumento da fração de sonda marcada cuja mobilidade é alterada (resultando também no decréscimo da sonda livre) é indicativa de uma ligação efetiva.

Esta conclusão é também apoiada pelos ensaios de competição, onde podemos verificar que quando o competidor inespecífico é adicionado não ocorre qualquer alteração da intensidade das bandas apresentadas (Figura 29-b). No ensaio em que se adiciona o competidor específico verifica-se um aumento da intensidade da banda correspondente a fração de sonda marcada livre quando comparada com o ensaio em que não se usou competidor e foi aplicada a mesma quantidade de regulador (Figura 29-b). Estes resultados indicam que há ligação desta proteína à zona promotora do gene *hcp2*.

No ensaio em que se usou a sonda *hcp1*, observou-se a o surgimento de bandas de posição alterada mas não se viu o aumento da intensidade da banda de posição alterada com o aumento de quantidade de regulador (Figura 29-a). No entanto, os ensaios de competição inespecífico apontam também um *binding*, uma vez que não ocorre alteração da intensidade das bandas. Já os resultados do ensaio de competição específica não foram claros (Figura 29-a). Assim não foi definitivamente provada a ligação do regulador HcpR à zona promotora do gene *hcp1*.

Em relação aos restantes genes testados neste trabalho, ensaios posteriores terão de ser realizados a fim de aferir a regulação peça HcpR.

Uma possível razão de não ter sido observada ligação para todas as zonas promotoras onde estão descritos possíveis motivos de *binding* para o regulador HcpR pode ser o facto da HcpR conter no seu N-terminal uma cauda de histidinas. Assim, o passo seguinte foi a produção de uma proteína sem cauda de histidinas (secção IV- 3.2.1).

3.3. Clonagem e expressão – pET24ahcpR

A clonagem do gene *hcpR* descrita atrás (secção IV-3.1) foi efectuada no vector de expressão pET28a⁺ que introduz nos seus produtos de expressão uma cauda N-terminal de histidinas. Para se obter uma proteína sem cauda de histidinas clonou-se esta ORF em pET24a. Este vector é em tudo semelhante ao pET28a, com a única diferença de não introduzir nos seus produtos de expressão qualquer tipo de

O processo de clonagem foi semelhante ao atrás descrito (secção IV-3.1), usando-se a mesma zona genómica e as mesmas enzimas de restrição para proceder à clonagem.

Após inserção do gene no vector, o vector recombinante foi transformado em células de *E.coli* XL1 competentes, que foram plaqueadas afim de serem submetidas a seleção. As colónias resultantes foram analisadas por PCR de colónias e os possíveis clones positivos foram digeridos usando as enzimas de clonagem para confirmar a correcta clonagem do gene (Figura 30).

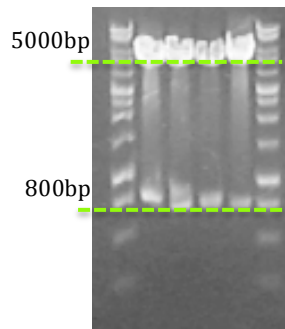


Figura 30 - Electroforese em gel de agarose (1%) das digestões efectuadas aos clones positivos de pET24hcpR

Como podemos observar, todos os clones submetidos a digestão apresentavam as bandas esperadas: uma perto dos 6000bp correspondendo ao vector linearizado e que possui aproximadamente 5.300bp, e outra a aproximadamente que corresponde ao insert que possui 791bp. Um dos clones foi sequenciado e o resultado foi alinhado com a sequência anotada para este gene. Verificou-se que a clonagem tinha sido efectuada corretamente, sendo concordante com a sequência anotada.

Este vector recombinante foi transformado em *E.coli* BL21 (DE3) Gold. A sua expressão foi testada aplicando as seguintes condições: OD_{600(indução)}=0,6, IPTG 400uM, 37°C, 2h, 150rpm. A sobre-expressão da proteína foi avaliada aplicando uma amostra em gel de SDS-Page. Visto querer-se apenas verificar a sobre-expressão da proteína de interesse e não se ir efectuar, de momento, o fraccionamento da amostra nem a sua purificação, fez-se um crescimento controlo, em que as células se encontravam transformadas como vector vazio e que foi submetido ao mesmo tratamento que os crescimentos (Figura 31).

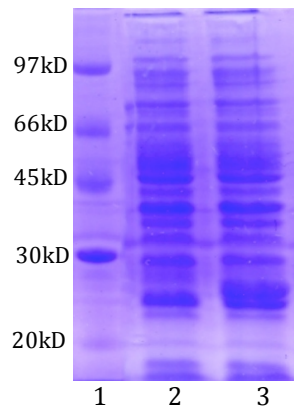


Figure 31 – Electroforese em gel de SDS-Page (12%) das amostras referentes ao crescimentos para expressão das células de *E.coli* BL21 (DE3) Gold. Poço 1) marcador molecular de baixo peso molecular, 2) estirpe transformada com pET24a (Controlo negativo) e 3) estirpe transformada com pET24ahcpR.

A expressão foi bem sucedida e esta proteína será usada em trabalhos posteriores para testar a afinidade da HcpR sem His-tag para as zonas promotoras em estudo.

4. Avaliação da expressão dos genes *hcp1*, *hcp2*, *roo1* e *roo2* no mutante $\Delta hcpR$

Como um dos objectivos deste trabalho era avaliar a regulação pela HcpR dos genes *hcp1* e *hcp2* de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, torna-se pertinente avaliar o padrão de expressão destes genes numa estirpe mutada em *hcpR*. Devido ao papel proposto para as Roo1 e Roo2, avaliou-se também a sua regulação pela HcpR.

O primeiro passo neste tipo de análise foi o isolamento do RNA total a partir de células Wt e do mutante $\Delta hcpR$ ($OD_{600}=1$). Após isolamento o RNA é submetido a incubação com DNaseI. Em cada passo a integridade do RNA foi verificada em gel (Figura 32-a e 32-b)

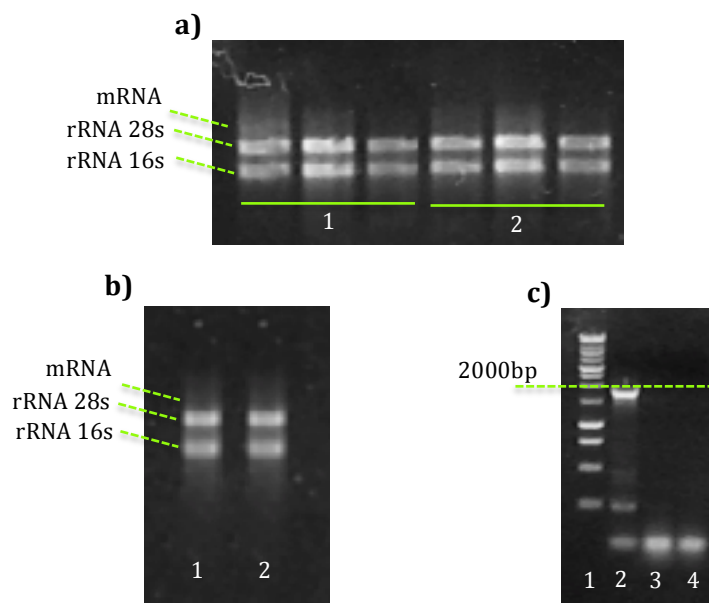


Figura 32 - Electroforese em gel de agarose a) RNA total isolado - 1) RNA Wt e 2) RNA $\Delta hcpR$, b) RNA após incubação com DNaseI 1- Wt; 2- $\Delta hcpR$, c) dos produtos de amplificação do PCR controlo para confirmação da inexistência de DNA contaminante - 1) marcador molecular 1kB; 2) DNA genómico com primers para *hcp2*; 3) RNA Wt; 4 - RNA $\Delta hcpR$.

Observam-se em gel duas bandas bem definidas (correspondentes ao rRNA16s e rRNA28s^[25]) que confirmam a integridade do RNA.

O RNA resultante foi submetido a um PCR para garantir a ausência de DNA (Figura 32-c). Observa-se o aparecimento de um banda de aproximadamente 2000bp na reação em que se usou como molde DNA genómico e a ausência de bandas para as reações em que se usou o RNA como molde, o que confirma a ausência de DNA.

É de referir que se usou a mesma quantidade de RNA nas reações de retrotranscrição (200ng/ μ L) de forma a que a concentração de cDNA obtido nas diferentes reações seja a mesma, tornando assim possível a comparação posterior dos dados.

Após retrotranscrição do RNA isolado (secção III-13) o cDNA foi analisado (Figura 32). O 16S rRNA foi usado como controlo interno. Verificamos que a intensidade das bandas correspondentes a *roo1* e *roo2* são semelhantes na estirpe selvagem e na estirpe mutada. Contudo, no que diz respeito às bandas referentes a *hcp1* e a *hcp2*, tal não aconteceu. No mutante, as bandas *hcp1* desaparecem enquanto que as bandas *hcp2* aumentam de intensidade.

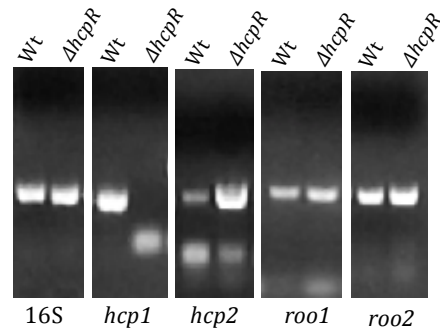


Figura 33 – Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação a partir do cDNA. Referente a cada umas das zonas, a primeira banda é referente ao Wt e a segunda ao mutante $\Delta hcpR$

Como se verifica na Figura 33, ocorre uma diminuição da expressão de *hcp1* no mutante e um aumento da expressão de *hcp2*. Isto indica que *hcp1* é regulado positivamente pela HcpR e que *hcp2* é negativamente regulada. Isto é contudo contraditório com os resultados obtidos por Judy Wall et al ^[128] que descrevem que num DNA *microarray* realizado com esta estirpe mutada, o gene *hcp2* encontra-se sub-expresso. Uma possível razão para a discrepância de resultados serão os primers usados na amplificação destes 2 genes. Uma vez que os genes sem causa possuem uma elevada identidade, pode acontecer que os primers usados estejam a emparelhar com alguma inespecificidade entre eles, o que poderá estar a causar a confusão de resultados. Outra explicação é que esteja a acontecer um reconhecimento inespecífico da *hcp1* pelas sondas utilizadas para a identificação da *hcp2* no *array* referido, o que levaria à conclusão de estar a ocorrer uma sub-expressão de *hcp2*, quando na realidade este efeito estaria a ser visto para *hcp1*.

Quanto ao nível de expressão da *roo1* e da *roo2*, estes não parecem ser diferentes no Wt e no mutante, indicando que o regulador em causa não tem qualquer papel na regulação destes dois genes.

Capítulo V – Considerações Finais

Um dos objectivos centrais do presente trabalho era avaliar o papel das *Hybrid Cluster Proteins* de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, com a finalidade de averiguar a sua contribuição na defesa de diferentes tipos de stress: oxigénio, peróxido de hidrogénio, nitrito e óxido nítrico.

Os dados obtidos, contudo, não apontam para um papel por parte dos produtos codificados pelos genes *hcp1* e *hcp2* na defesa a qualquer um dos tipos de stress referido. Os mutantes para estes genes não viram a sua viabilidade significativamente comprometida quando submetidos a stress por oxigénio, peróxido de hidrogénio e nitrito (quando comparado com a estirpe em que os genes estão presente –Wt). Nos ensaios de complementação, as células sensíveis ao NO, não viram a sua viabilidade aumentada quando lhes foi inserido os genes *hcp1* e *hcp2*.

Nos ensaios de complementação, contudo, foi também incluído o gene *roo1*. Ao contrário do observado para os genes *hcp1* e *hcp2*, as células em que se inseriu o gene *roo1* viram a sua viabilidade aumentada, o que significa que ocorreu complementação da mutação de que são detentoras. Isto significa que o produto deste gene protege a célula do óxido nítrico.

Contudo, os mutantes *D. vulgaris* Hildenborough para estes dois genes, quando expostos a stress pelo NO, não viram a sua sensibilidade ao NO acrescida. Este comportamento pode ser devido à existência de outros mecanismo de defesa que mascaram o papel destes genes.

Foi também avaliada a afinidade da HcpR para as zonas promotoras dos genes *hcp1* e *hcp2* (bem como dos genes *fld*, *feoA* e *ahpC*) através de ensaios de EMSA. Pudemos concluir claramente que existe de facto interação entre a zona promotora do gene *hcp2* e este regulador. Embora os dados apontem para que o mesmo seja verdade para o genes *hcp1* e *feoA*, uma averiguação mais profunda terá de ser realizada. Para os genes *fld* e *ahpC*, contudo, não foi observado qualquer indício de interação. Isto motivou a clonagem do gene *hcpR* em pET24a, afim de se proceder á sua expressão, obtendo-se uma proteína sem His-tag, para aplicações futuras. Esta estratégia visa garantir que a ausência de interação observada não é causada pela presença de histidinas que interfiram na ligação do regulador ao alvo.

Analisaram-se também os níveis de expressão dos genes *hcp1*, *hcp2*, *roo1* e *roo2* no mutante $\Delta hcpR$ para estudar a possível regulação pela HcpR. Observámos que as Roo's não vêm a sua expressão alterada como resultado da mutação existente na estirpe e que tanto *hcp1* como *hcp2* sofrem uma alteração de expressão. O padrão de alteração demonstrado por estes genes, sugere uma regulação positiva, por parte da HcpR, para *hcp1* e uma regulação negativa para *hcp2*.

Bibliografia

1. ALMEIDA C.C., ROMAO C.V., LINDLEY P.F., TEIXEIRA M. & SARAIVA L.M. 2006. The role of the hybrid cluster protein in oxidative stress defense. *J Biol Chem* 281: 32445-32450.
2. ARAGAO D., MACEDO S., MITCHELL E.P., ROMAO C.V., LIU M.Y., FRAZAO C., SARAIVA L.M., XAVIER A.V., LEGALL J., VAN DONGEN W.M., HAGEN W.R., TEIXEIRA M., CARRONDO M.A. & LINDLEY P. 2003. Reduced hybrid cluster proteins (HCP) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 and *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough): X-ray structures at high resolution using synchrotron radiation. *J Biol Inorg Chem* 8: 540-548.
3. ARENDSSEN A.F., HADDEN J., CARD G., MCALPINE A.S., BAILEY S., ZAITSEV V., DUKE E.H.M., LINDLEY P.F., KRÖCKEL M., TRAUTWEIN A.X., FEITERS M.C., CHARNOCK J.M., GARNER C.D., MARRITT S.J., THOMSON A.J., KOOTER I.M., JOHNSON M.K., VAN DEN BERG W.A.M., VAN DONGEN W.M.A.M. & HAGEN W.R. 1998. The "prismane" protein resolved: X-ray structure at 1.7 Å and multiple spectroscopy of two novel 4Fe clusters. *J Biochem. Inorg. Chem.* 3: 81-95.
4. BAILEY S., COOPER S.J., HAGEN W.F., ARENDSSEN A.F. & LINDLEY P. 2006. Hybrid cluster protein. *Handbook of Metalloproteins*
5. BAPTISTA J.M., JUSTINO M.C., MELO A.M., TEIXEIRA M. & SARAIVA L.M. 2012. Oxidative stress modulates the nitric oxide defense promoted by *Escherichia coli* flavorubredoxin. *J Bacteriol* 194: 3611-3617.
6. BAUMGARTNER L.K., REID R.P., DUPRAZ C., DECHO A.W., BUCKLEY D.H., SPEAR J.R., PRZEKOP K.M. & VISSCHER P.T. 2006. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology* 185: 131-145.
7. BORGLIN S., JOYNER D., JACOBSEN J., MUKHOPADHYAY A. & HAZEN T.C. 2009. Overcoming the anaerobic hurdle in phenotypic microarrays: generation and visualization of growth curve data for *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Microbiol Methods* 76: 159-168.
8. BRIGELIUS-FLOHE R. 2009. Commentary: oxidative stress reconsidered. *Genes Nutr* 4: 161-163.
9. BRIOLAT V. & REYSSET G. 2002. Identification of the *Clostridium perfringens* genes involved in the adaptive response to oxidative stress. *J Bacteriol* 184: 2333-2343.
10. BRIOUKHANOV A.L., DURAND M.C., DOLLA A. & AUBERT C. 2010. Response of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to hydrogen peroxide: enzymatic and transcriptional analyses. *FEMS Microbiol Lett* 310: 175-181.
11. BROWNING D.F., BEATTY C.M., WOLFE A.J., COLE J.A. & BUSBY S.J. 2002. Independent regulation of the divergent *Escherichia coli* *nrfA* and *acsP1* promoters by a nucleoprotein assembly at a shared regulatory region. *Mol Microbiol* 43: 687-701.
12. CADBY I.T., BUSBY S.J. & COLE J.A. 2011. An HcpR homologue from *Desulfovibrio*

desulfuricans and its possible role in nitrate reduction and nitrosative stress. *Biochem Soc Trans* 39: 224-229.

13. CHANG Y.J., PEACOCK A.D., LONG P.E., STEPHEN J.R., MCKINLEY J.P., MACNAUGHTON S.J., HUSSAIN A.K., SAXTON A.M. & WHITE D.C. 2001. Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Appl Environ Microbiol* 67: 3149-3160.
14. CHEN C.J., LIN Y.H., HUANG Y.C. & LIU M.Y. 2006. Crystal structure of rubredoxin from *Desulfovibrio gigas* to ultra-high 0.68 Å resolution. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 79-90.
15. CHHABRA S.R., JOACHIMIAK M.P., PETZOLD C.J., ZANE G.M., PRICE M.N., REVECO S.A., FOK V., JOHANSON A.R., BATTH T.S., SINGER M., CHANDONIA J.M., JOYNER D., HAZEN T.C., ARKIN A.P., WALL J.D., SINGH A.K. & KEASLING J.D. 2011. Towards a rigorous network of protein-protein interactions of the model sulfate reducer *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *PLoS One* 6: e21470.
16. CHISMON D.L., BROWNING D.F., FARRANT G.K. & BUSBY S.J. 2010. Unusual organization, complexity and redundancy at the *Escherichia coli* hcp-hcr operon promoter. *Biochem J* 430: 61-68.
17. CLARK M.E., EDELMANN R.E., DULEY M.L., WALL J.D. & FIELDS M.W. 2007. Biofilm formation in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is dependent upon protein filaments. *Environ Microbiol* 9: 2844-2854.
18. COOPER S.J., GARNER C.D., HAGEN W.R., LINDLEY P.F. & BAILEY S. 2000. Hybrid-cluster protein (HCP) from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) at 1.6 Å resolution. *Biochemistry* 39: 15044-15054.
19. COULTER E.D. & KURTZ D.M.J. 2001. A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase. *Arch Biochem Biophys* 394: 76-86.
20. DAVIDOVA I., HICKS M.S., FEDORAK P.M. & SUFLITA J.M. 2001. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27: 80-86.
21. DENG M.D., SEVERSON D.K., GRUND A.D., WASSINK S.L., BURLINGAME R.P., BERRY A., RUNNING J.A., KUNESH C.A., SONG L., JERRELL T.A. & ROSSON R.A. 2005. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for industrial production of glucosamine and N-acetylglucosamine. *Metab Eng* 7: 201-214.
22. DEVEREUX R., HE S.H., DOYLE C.L., ORKLAND S., STAHL D.A., LEGALL J. & WHITMAN W.B. 1990. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol* 172: 3609-3619.
23. DOLLA A., FOURNIER M. & DERMOUN Z. 2006. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *J Biotechnol* 126: 87-100.
24. ELIAS D.A., MUKHOPADHYAY A., JOACHIMIAK M.P., DRURY E.C., REDDING A.M., YEN H.C., FIELDS M.W., HAZEN T.C., ARKIN A.P., KEASLING J.D. & WALL J.D. 2009. Expression profiling of hypothetical genes in *Desulfovibrio vulgaris* leads to improved functional annotation. *Nucleic Acids Res* 37: 2926-2939.

25. FARNWOR R., KEATING J., MCAULEY M. & SMITH R. 2004. Optimization of a Protocol for Escherichia coli RNA Extraction and Visualization. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* 5: 61-64.
26. FILENKO N., SPIRO S., BROWNING D.F., SQUIRE D., OVERTON T.W., COLE J. & CONSTANTINIDOU C. 2007. The NsrR regulon of Escherichia coli K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase. *J Bacteriol* 189: 4410-4417.
27. FILENKO N.A., BROWNING D.F. & COLE J.A. 2005. Transcriptional regulation of a hybrid cluster (prismane) protein. *Biochem Soc Trans* 33: 195-197.
28. FINEGOLD S.M. 2011. Desulfovibrio species are potentially important in regressive autism. *Med Hypotheses* 77: 270-274.
29. FINEGOLD S.M. 2011. State of the art; microbiology in health and disease. Intestinal bacterial flora in autism. *Anaerobe* 17: 367-368.
30. FINEGOLD S.M., DOWNES J. & SUMMANEN P.H. 2012. Microbiology of regressive autism. *Anaerobe* 18: 260-262.
31. FLATLEY J., BARRETT J., PULLAN S.T., HUGHES M.N., GREEN J. & POOLE R.K. 2005. Transcriptional responses of Escherichia coli to S-nitrosoglutathione under defined chemostat conditions reveal major changes in methionine biosynthesis. *J Biol Chem* 280: 10065-10072.
32. FORRESTER M.T. & FOSTER M.W. 2012. Protection from nitrosative stress: a central role for microbial flavohemoglobin. *Free Radic Biol Med* 52: 1620-1633.
33. FOURNIER M., ZHANG Y., WILDSCHUT J.D., DOLLA A., VOORDOUW J.K., SCHRIEMER D.C. & VOORDOUW G. 2003. Function of oxygen resistance proteins in the anaerobic, sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio vulgaris hildenborough. *J Bacteriol* 185: 71-79.
34. FOURNIER M., DERMOUN Z., DURAND M.C. & DOLLA A. 2004. A new function of the Desulfovibrio vulgaris Hildenborough [Fe] hydrogenase in the protection against oxidative stress. *J Biol Chem* 279: 1787-1793.
35. FOURNIER M., AUBERT C., DERMOUN Z., DURAND M.C., MOINIER D. & DOLLA A. 2006. Response of the anaerobe Desulfovibrio vulgaris Hildenborough to oxidative conditions: proteome and transcript analysis. *Biochimie* 88: 85-94.
36. FUKUMORI F. & SAINT C.P. 1997. Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in Pseudomonas putida UCC22(pTDN1). *J Bacteriol* 179: 399-408.
37. GABOR K., VERISSIMO C.S., CYRAN B.C., TER HORST P., MEIJER N.P., SMIDT H., DE VOS W.M. & VAN DER OOST J. 2006. Characterization of CprK1, a CRP/FNR-type transcriptional regulator of halo-respiration from Desulfotobacterium hafniense. *J Bacteriol* 188: 2604-2613.
38. GADD G.M. & WHITE C. 1993. Microbial treatment of metal pollution--a working biotechnology? *Trends Biotechnol* 11: 353-359.

39. GANESH R., ROBINSON K.G., REED G.D. & SAYLER G.S. 1997. Reduction of hexavalent uranium from organic complexes by sulfate- and iron-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63: 4385-4391.
40. GARDNER A.M., HELMICK R.A. & GARDNER P.R. 2002. Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277: 8172-8177.
41. GAUDREAU M., GINGRAS M.E., LESSARD M., LECLERC S. & GUERIN S.L. 2009. Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA-protein interactions. *Methods Mol Biol* 543: 15-35.
42. GOLDSTEIN E.J., CITRON D.M., PERAINO V.A. & CROSS S.A. 2003. *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia and review of human *Desulfovibrio* infections. *J Clin Microbiol* 41: 2752-2754.
43. GOLLER C., WANG X., ITOH Y. & ROMEO T. 2006. The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates pgaABCD transcription, required for production of the biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol* 188: 8022-8032.
44. GOUGH D.R. & COTTER T.G. 2011. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis* 2: e213.
45. GRAINGER D.C., AIBA H., HURD D., BROWNING D.F. & BUSBY S.J. 2007. Transcription factor distribution in *Escherichia coli*: studies with FNR protein. *Nucleic Acids Res* 35: 269-278.
46. HAGEN W.R., PIERIK A.J. & VEEGER C. 1989. Novel electron paramagnetic resonance signals from an Fe/S protein containing six iron atoms. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 85: 4083-4090.
47. HAMILTON W.A. 2003. Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling* 19: 65-76.
48. HANSEN T.A. 1994. Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66: 165-185.
49. HARASZTHY V.I., LALLY E.T., HARASZTHY G.G. & ZAMBON J.J. 2002. Molecular cloning of the fur gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 70: 3170-3179.
50. HAVEMAN S.A., GREENE E.A., STILWELL C.P., VOORDOUW J.K. & VOORDOUW G. 2004. Physiological and gene expression analysis of inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* hildenborough by nitrite. *J Bacteriol* 186: 7944-7950.
51. HE Q., HUANG K.H., HE Z., ALM E.J., FIELDS M.W., HAZEN T.C., ARKIN A.P., WALL J.D. & ZHOU J. 2006. Energetic consequences of nitrite stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, inferred from global transcriptional analysis. *Appl Environ Microbiol* 72: 4370-4381.
52. HE Q., HE Z., JOYNER D.C., JOACHIMIAK M., PRICE M.N., YANG Z.K., YEN H.C.,

- HEMME C.L., CHEN W., FIELDS M.M., STAHL D.A., KEASLING J.D., KELLER M., ARKIN A.P., HAZEN T.C., WALL J.D. & ZHOU J. 2010. Impact of elevated nitrate on sulfate-reducing bacteria: a comparative study of *Desulfovibrio vulgaris*. *ISME J* 4: 1386-1397.
53. HEIDELBERG J.F., SESHADRI R., HAVEMAN S.A., HEMME C.L., PAULSEN I.T., KOLONAY J.F., EISEN J.A., WARD N., METHE B., BRINKAC L.M., DAUGHERTY S.C., DEBOY R.T., DODSON R.J., DURKIN A.S., MADUPU R., NELSON W.C., SULLIVAN S.A., FOUTS D., HAFT D.H., SELENGUT J., PETERSON J.D., DAVIDSEN T.M., ZAFAR N., ZHOU L., RADUNE D., DIMITROV G., HANCE M., TRAN K., KHOURI H., GILL J., UTTERBACK T.R., FELDBLYUM T.V., WALL J.D., VOORDOUW G. & FRASER C.M. 2004. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Nat Biotechnol* 22: 554-559.
 54. HELLMAN L.M. & FRIED M.G. 2007. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* 2: 1849-1861.
 55. HUBERT C., NEMATI M., JENNEMAN G. & VOORDOUW G. 2005. Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 272-282.
 56. JOHNSON M.K. 1998. Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Curr Opin Chem Biol* 2: 173-181.
 57. JOHNSTON S., LIN S., LEE P., CAFFREY S.M., WILDSCHUT J., VOORDOUW J.K., DA SILVA S.M., PEREIRA I.A. & VOORDOUW G. 2009. A genomic island of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough promotes survival under stress conditions while decreasing the efficiency of anaerobic growth. *Environ Microbiol* 11: 981-991.
 58. JUSTINO M.C., VICENTE J.B., TEIXEIRA M. & SARAIVA L.M. 2005. New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. *J Biol Chem* 280: 2636-2643.
 59. KACZANOWSKA M. & RYDEN-AULIN M. 2004. Temperature sensitivity caused by mutant release factor 1 is suppressed by mutations that affect 16S rRNA maturation. *J Bacteriol* 186: 3046-3055.
 60. KANTA J. 2011. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 54: 97-101.
 61. KELLER K.L. & WALL J.D. 2011. Genetics and molecular biology of the electron flow for sulfate respiration in *Desulfovibrio*. *Front Microbiol* 2: 135.
 62. KIM S.W., LI Z., MOORE P.S., MONAGHAN A.P., CHANG Y., NICHOLS M. & JOHN B. 2010. A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. *Nucleic Acids Res* 38: e98.
 63. KRISHNAMURTHY P., ROSS D.D., NAKANISHI T., BAILEY-DELL K., ZHOU S., MERCER K.E., SARKADI B., SORRENTINO B.P. & SCHUETZ J.D. 2004. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 279: 24218-24225.
 64. KROCKEL M., TRAUTWEIN A.X., ARENDSSEN A.F. & HAGEN W.R. 1998. The

- prismane protein resolved--Mossbauer investigation of a 4Fe cluster with an unusual mixture of bridging ligands and metal coordinations. *Eur J Biochem* 251: 454-461.
65. LAMRABET O., PIEULLE L., AUBERT C., MOUHAMAR F., STOCKER P., DOLLA A. & BRASSEUR G. 2011. Oxygen reduction in the strict anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: characterization of two membrane-bound oxygen reductases. *Microbiology* 157: 2720-2732.
 66. LE CHATELIER E., JANNIERE L., EHRLICH S.D. & CANCEILL D. 2001. The RepE initiator is a double-stranded and single-stranded DNA-binding protein that forms an atypical open complex at the onset of replication of plasmid pAMBeta 1 from Gram-positive bacteria. *J Biol Chem* 276: 10234-10246.
 67. LEE M.H., CAFFREY S.M., VOORDOUW J.K. & VOORDOUW G. 2010. Effects of biocides on gene expression in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 1109-1118.
 68. LLOYD J.R., RIDLEY J., KHIZNIAK T., LYALIKOVA N.N. & MACASKIE L.E. 1999. Reduction of technetium by *Desulfovibrio desulfuricans*: biocatalyst characterization and use in a flowthrough bioreactor. *Appl Environ Microbiol* 65: 2691-2696.
 69. LLOYD J.R. 2003. Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiol Rev* 27: 411-425.
 70. LOVLEY D.R. & PHILLIPS E.J. 1992. Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol* 58: 850-856.
 71. LOVLEY D.R., WIDMAN P.K., WOODWARD J.C. & PHILLIPS E.J. 1993. Reduction of uranium by cytochrome c3 of *Desulfovibrio vulgaris*. *Appl Environ Microbiol* 59: 3572-3576.
 72. LOVLEY D.R. 1995. Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *J Ind Microbiol* 14: 85-93.
 73. LUMPPPIO H.L., SHENVI N.V., SUMMERS A.O., VOORDOUW G. & KURTZ D.M.J. 2001. Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system. *J Bacteriol* 183: 101-108.
 74. MACEDO S., MITCHELL E.P., ROMAO C.V., COOPER S.J., COELHO R., LIU M.Y., XAVIER A.V., LEGALL J., BAILEY S., GARNER D.C., HAGEN W.R., TEIXEIRA M., CARRONDO M.A. & LINDLEY P. 2002. Hybrid cluster proteins (HCPs) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 and *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough): X-ray structures at 1.25 Å resolution using synchrotron radiation. *J Biol Inorg Chem* 7: 514-525.
 75. MACH-AIGNER A.R., GROSSTESSNER-HAIN K., POCAS-FONSECA M.J., MECHTLER K. & MACH R.L. 2010. From an electrophoretic mobility shift assay to isolated transcription factors: a fast genomic-proteomic approach. *BMC Genomics* 11: 644.
 76. MICHEL C., BRUGNA M., AUBERT C., BERNADAC A. & BRUSCHI M. 2001. Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate-reducing

- bacteria. Key role of polyheme cytochromes c and hydrogenases. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 95-100.
77. MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., DUNLAP P.V., CLARK D.P. Brock Biology of Microorganisms, 12th Edition, Pearson International Edition
 78. MISHRA S. & IMLAY J. 2012. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch Biochem Biophys* 525: 145-160.
 79. MOURA I., TAVARES P., MOURA J.J., RAVI N., HUYNH B.H., LIU M.Y. & LEGALL J. 1992. Direct spectroscopic evidence for the presence of a 6Fe cluster in an iron-sulfur protein isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774). *J Biol Chem* 267: 4489-4496.
 80. MUKHOPADHYAY A., HE Z., ALM E.J., ARKIN A.P., BAIDOO E.E., BORGLIN S.C., CHEN W., HAZEN T.C., HE Q., HOLMAN H.Y., HUANG K., HUANG R., JOYNER D.C., KATZ N., KELLER M., OELLER P., REDDING A., SUN J., WALL J., WEI J., YANG Z., YEN H.C., ZHOU J. & KEASLING J.D. 2006. Salt stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: an integrated genomics approach. *J Bacteriol* 188: 4068-4078.
 81. MUKHOPADHYAY A., REDDING A.M., JOACHIMIAK M.P., ARKIN A.P., BORGLIN S.E., DEHAL P.S., CHAKRABORTY R., GELLER J.T., HAZEN T.C., HE Q., JOYNER D.C., MARTIN V.J., WALL J.D., YANG Z.K., ZHOU J. & KEASLING J.D. 2007. Cell-wide responses to low-oxygen exposure in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Bacteriol* 189: 5996-6010.
 82. MUYZER G. & STAMS A.J. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6: 441-454.
 83. NEMATI M., JENNEMAN G.E. & VOORDOUW G. 2001. Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. *Biotechnol Bioeng* 74: 424-434.
 84. NEMATI M., JENNEMAN G.E. & VOORDOUW G. 2001. Impact of nitrate-mediated microbial control of souring in oil reservoirs on the extent of corrosion. *Biotechnol Prog* 17: 852-859.
 85. NERIA-GONZALEZ I., WANG E.T., RAMIREZ F., ROMERO J.M. & HERNANDEZ-RODRIGUEZ C. 2006. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. *Anaerobe* 12: 122-133.
 86. PALMER C.D. & WITTBRODT P.R. 1991. Processes affecting the remediation of chromium-contaminated sites. *Environ Health Perspect* 92: 25-40.
 87. PARTRIDGE J.D., BROWNING D.F., XU M., NEWNHAM L.J., SCOTT C., ROBERTS R.E., POOLE R.K. & GREEN J. 2008. Characterization of the *Escherichia coli* K-12 *ydhYVWXUT* operon: regulation by FNR, NarL and NarP. *Microbiology* 154: 608-618.
 88. PAYNE R.B., GENTRY D.M., RAPP-GILES B.J., CASALOT L. & WALL J.D. 2002. Uranium reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* strain G20 and a cytochrome c3 mutant. *Appl Environ Microbiol* 68: 3129-3132.

89. PIERIK A.J., HAGEN W.R., DUNHAM W.R. & SANDS R.H. 1992. Multi-frequency EPR and high-resolution Mossbauer spectroscopy of a putative [6Fe-6S] prismane-cluster-containing protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). Characterization of a supercluster and superspin model protein. *Eur J Biochem* 206: 705-719.
90. PIERIK A.J., WOLBERT R.B., MUTSAERS P.H., HAGEN W.R. & VEEGER C. 1992. Purification and biochemical characterization of a putative [6Fe-6S] prismane-cluster-containing protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Eur J Biochem* 206: 697-704.
91. PLUGGE C.M., ZHANG W., SCHOLTEN J.C. & STAMS A.J. 2011. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Front Microbiol* 2: 81.
92. POSTGATE J.R. & CAMPBELL L.L. 1966. Classification of *Desulfovibrio* species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria. *Bacteriol Rev* 30: 732-738.
93. PRICE M.N., DEUTSCHBAUER A.M., KUEHL J.V., LIU H., WITKOWSKA H.E. & ARKIN A.P. 2011. Evidence-based annotation of transcripts and proteins in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Bacteriol* 193: 5716-5727.
94. REDDING A.M., MUKHOPADHYAY A., JOYNER D.C., HAZEN T.C. & KEASLING J.D. 2006. Study of nitrate stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough using iTRAQ proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5: 133-143.
95. RODIONOV D.A., DUBCHAK I., ARKIN A., ALM E. & GELFAND M.S. 2004. Reconstruction of regulatory and metabolic pathways in metal-reducing delta-proteobacteria. *Genome Biol* 5: R90.
96. RODIONOV D.A., DUBCHAK I.L., ARKIN A.P., ALM E.J. & GELFAND M.S. 2005. Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. *PLoS Comput Biol* 1: e55.
97. RODRIGUES R., VICENTE J.B., FELIX R., OLIVEIRA S., TEIXEIRA M. & RODRIGUES-POUSADA C. 2006. *Desulfovibrio gigas* flavodiiron protein affords protection against nitrosative stress in vivo. *J Bacteriol* 188: 2745-2751.
98. SANDAA R., TORSVIK V.V., Enger DAAE F.L., CASTBERG T. & HAHN D. 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiol Ecol* 30: 237-251.
99. SANDLER R.H., FINEGOLD S.M., BOLTE E.R., BUCHANAN C.P., MAXWELL A.P., VAISANEN M.L., NELSON M.N. & WEXLER H.M. 2000. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol* 15: 429-435.
100. SANTANA M. & CRASNIER-MEDNANSKY M. 2006. The adaptive genome of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *FEMS Microbiol Lett* 260: 127-133.
101. SETH D., HAUSLADEN A., WANG Y.J. & STAMLER J.S. 2012. Endogenous protein S-Nitrosylation in *E. coli*: regulation by OxyR. *Science* 336: 470-473.
102. SHAKOORI A.R., TAHSEEN S. & HAQ R.U. 1999. Chromium-tolerant bacteria

- isolated from industrial effluents and their use in detoxication of hexavalent chromium. *Folia Microbiol (Praha)* 44: 50-54.
103. SILAGHI-DUMITRESCU R., COULTER E.D., DAS A., LJUNGDAHL L.G., JAMESON G.N., HUYNH B.H. & KURTZ D.M.J. 2003. A flavodiiron protein and high molecular weight rubredoxin from *Moorella thermoacetica* with nitric oxide reductase activity. *Biochemistry* 42: 2806-2815.
 104. SILVA G., OLIVEIRA S., LEGALL J., XAVIER A.V. & RODRIGUES-POUSADA C. 2001. Analysis of the *Desulfovibrio gigas* transcriptional unit containing rubredoxin (rd) and rubredoxin-oxygen oxidoreductase (roo) genes and upstream ORFs. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 491-502.
 105. SMITH M.F.J. & DELBARY-GOSSART S. 2001. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). *Methods Mol Med* 50: 249-257.
 106. STOKKERMANS J.P., PIERIK A.J., WOLBERT R.B., HAGEN W.R., VAN DONGEN W.M. & VEEGER C. 1992. The primary structure of a protein containing a putative [6Fe-6S] prismane cluster from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Eur J Biochem* 208: 435-442.
 107. VAN DEN BERG W.A., HAGEN W.R. & VAN DONGEN W.M. 2000. The hybrid-cluster protein ('prismane protein') from *Escherichia coli*. Characterization of the hybrid-cluster protein, redox properties of the [2Fe-2S] and [4Fe-2S-2O] clusters and identification of an associated NADH oxidoreductase containing FAD and [2Fe-2S]. *Eur J Biochem* 267: 666-676.
 108. VICTOR B.L., VICENTE J.B., RODRIGUES R., OLIVEIRA S., RODRIGUES-POUSADA C., FRAZAO C., GOMES C.M., TEIXEIRA M. & SOARES C.M. 2003. Docking and electron transfer studies between rubredoxin and rubredoxin:oxygen oxidoreductase. *J Biol Inorg Chem* 8: 475-488.
 109. VICTOR B.L., BAPTISTA A.M. & SOARES C.M. 2009. Dioxygen and nitric oxide pathways and affinity to the catalytic site of rubredoxin:oxygen oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas*. *J Biol Inorg Chem* 14: 853-862.
 110. VOORDOUW G. 1995. The genus *desulfovibrio*: the centennial. *Appl Environ Microbiol* 61: 2813-2819.
 111. WILDSCHUT J.D., LANG R.M., VOORDOUW J.K. & VOORDOUW G. 2006. Rubredoxin:oxygen oxidoreductase enhances survival of *Desulfovibrio vulgaris* hildenborough under microaerophilic conditions. *J Bacteriol* 188: 6253-6260.
 112. WILDSCHUT J.D., CAFFREY S.M., VOORDOUW J.K. & VOORDOUW G. 2012. Oxygen exposure increases resistance of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to killing by hydrogen peroxide. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101: 303-311.
 113. WOESE C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271.
 114. WOLFE M.T., HEO J., GARAVELLI J.S. & LUDDEN P.W. 2002. Hydroxylamine reductase activity of the hybrid cluster protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 5898-5902.
 115. YUE C., MUTSUGA N., SCORDALAKES E.M. & GAINER H. 2006. Studies of oxytocin

- and vasopressin gene expression in the rat hypothalamus using exon- and intron-specific probes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1233-41.
116. ZHOU A., HE Z., REDDING-JOHANSON A.M., MUKHOPADHYAY A., HEMME C.L., JOACHIMIAK M.P., LUO F., DENG Y., BENDER K.S., HE Q., KEASLING J.D., STAHL D.A., FIELDS M.W., HAZEN T.C., ARKIN A.P., WALL J.D. & ZHOU J. 2010. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress responses in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Environ Microbiol* 12: 2645-2657.
117. ZHOU A., CHEN Y.I., ZANE G.M., HE Z., HEMME C.L., JOACHIMIAK M.P., BAUMOHL J.K., HE Q., FIELDS M.W., ARKIN A.P., WALL J.D., HAZEN T.C. & ZHOU J. 2012. Functional characterization of Crp/Fnr-type global transcriptional regulators in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Appl Environ Microbiol* 78: 1168-1177.
118. ZHOU J., HE Q., HEMME C.L., MUKHOPADHYAY A., HILLESLAND K., ZHOU A., HE Z., VAN NOSTRAND J.D., HAZEN T.C., STAHL D.A., WALL J.D. & ARKIN A.P. 2011. How sulphate-reducing microorganisms cope with stress: lessons from systems biology. *Nat Rev Microbiol* 9: 452-466.